普通高等教育“十五”国家级规划教材

植物细胞工程

谢从华　柳俊　主编

高等教育出版社
Higher Education Press

内容简介

植物细胞工程是在植物组织培养基础上发展起来的新学科，具有基础理论与实验技术并举的特点。本书以植物细胞工程的基本概念、基本原理和基本技术为主线，系统阐述了植物细胞工程的原理和技术，同时介绍了该学科领域的发展动态。全书由绪论和另外10章组成。绪论重点介绍了细胞工程的概念、发展史及其在现代生物技术中的地位与作用。第一章至第三章阐述了细胞工程的基本技术和理论基础。第四章至第七章分类介绍了植物细胞工程的主要技术。第八章至第十章分别介绍了植物细胞工程在人工种子生产、种质保存和植物遗传转化领域的应用。为方便读者查阅，书中详尽地列出了所引用资料的来源。书后还附有中英文名词对照和所涉及的植物材料的中文和拉丁文学名。

本书是普通高等教育“十五”国家级规划教材，适用于生物科学、生物技术和生物工程专业的本科、研究生教学，也可供植物科学相关领域的研究人员参考。

图书在版编目（CIP）数据

植物细胞工程／谢从华，柳俊主编．—北京：高等教育出版社，2004.6
ISBN 7-04-014593-6

Ⅰ.植… Ⅱ.①谢…②柳… Ⅲ.植物—细胞工程—高等学校—教材 Ⅳ.Q943

中国版本图书馆CIP数据核字（2004）第048895号

策划编辑 王 莉　责任编辑 田 军　封面设计 张 楠
责任绘图 尹文军　版式设计 马静如　责任校对 朱惠芳　责任印制

出版发行 高等教育出版社　购书热线 010-64054588
社 址 北京市西城区德外大街4号　免费咨询 800-810-0598
邮政编码 100011　网 址 http://www.hep.edu.cn
总 机 010-82028899　http://www.hep.com.cn

经 销 新华书店北京发行所
印 刷

开 本 787×1092 1/16　版 次 年 月第1版
印 张 18.75　印 次 年 月第 次印刷
字 数 450 000　定 价 23.60元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题，请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

《植物细胞工程》编写人员（按章的顺序排列）

绪　论		谢从华	华中农业大学园艺林学学院教授，博士
第一章	细胞全能性与形态发生	柳　俊	华中农业大学生命科学技术学院教授，博士
第二章	离体培养下的遗传与变异	柳　俊	
第三章	植物细胞工程技术原理	谢从华	
第四章	植物组织和器官培养	谢从华	
第五章	植物细胞培养及次生代谢产物生产	柳　俊	
第六章	原生质体培养	谢从华	
		司怀军	甘肃农业大学农学院副教授，博士
第七章	植物体细胞杂交	司怀军	
		谢从华	
第八章	人工种子	柳　俊	
		薛建平	安徽煤炭师范学院副教授，博士
第九章	植物种质资源离体超低温保存	姜　玲	华中农业大学园艺林学学院副教授，博士
第十章	植物基因转化受体系统	林拥军	华中农业大学生命科学技术学院副教授，博士

前　言

本书是普通高等教育“十五”国家级规划教材，其编写目的在于系统阐述植物细胞工程的原理和技术，同时介绍该学科领域的发展动态。

细胞工程是一门综合性的生物技术学科。细胞工程的研究对象是所有以细胞为基础的生物体，其研究目标是在细胞、组织和器官水平上对生物进行遗传改良，生长发育调控，或进行特殊产物的生产。由于生物的遗传、生长发育和物质代谢等是生命科学研究的基础范畴，因此，细胞工程学科的发展速度也随着分子生物学、细胞生物学、发育生物学、生理学、遗传学及其它生物类学科的飞速发展而加快，同时也与计算机科学、材料科学等应用学科的进步密切相关。细胞工程学科的发展反过来又为其它生命学科提供了桥梁和载体，促进了这些学科的发展与进步。植物细胞工程是细胞工程的主要分支，在这样一种多学科相互渗透的背景下，要建立一个相对独立而又与其它学科有机联系的植物细胞工程学科的知识体系，既是本书试图解决的重点，同时由于这是一门正处于快速发展阶段的新兴学科，因此也是本书编写过程中所一直面对的一个难点。

植物细胞工程的理论基础是细胞全能性学说，其研究技术涉及细胞器、细胞、组织和器官水平在利用工程技术原理和手段进行的各类体外操作。因此，本书以基本原理介绍为切入点，以不同类型的技术范畴为骨架，构建成本书的基本结构。在各章节编写时，力求理论阐述与技术介绍并重，使本书在作为教材使用的同时，也具备工具书的性质；注重将现有技术归纳与发展趋势介绍相结合，客观地反映本学科相关领域的重点和尚待研究解决的科学问题，使之对专业人士具有一定的参考作用 强调本学科知识的系统性及其与其它相关学科相辅相成的关系，以体现细胞工程作为一门综合性技术学科所存在的多学科渗透融合的内涵，帮助读者正确理解和解释本学科所涉及的科学现象。

本书由绪论和另外十章组成。绪论重点介绍了植物细胞工程的概念、发展历史及与其它学科的相互关系，论述了细胞工程在现代生物技术中的地位与作用。前三章是细胞工程的基本技术和原理，相当于总论。第一章从植物细胞工程的理论基础出发，介绍了细胞全能性的概念和离体条件下器官发生的机理，从理论上认识细胞工程技术产生、发展和应用的原理。第二章重点阐述了离体条件下的遗传变异与调控，以了解和科学分析植物细胞工程技术应用过程中的生命现象，为后面介绍专门技术奠定基础。第三章是植物细胞工程研究的基本技术介绍，重点讨论了离体培养对环境和营养条件的要求等一些共性问题。因为细胞工程从广义上讲包括细胞、组织和器官培养，而细胞培养与其它培养在目的和应用的技术上都存在差异，因此第四章专门论述了主要的植物组织和器官培养技术，包括植物茎尖分生组织培养、病毒脱除与快速繁殖，花药与花粉培养，胚胎与子房培养等。第五章至第七章分类介绍了目前研究较多、应用较广泛的主要植物细胞培养技术，包括植物细胞培养与次生代谢产物生产、植物原生质体培养和体细胞杂交等，这些是植物细胞工程技术在遗传改良和代谢调控方面取得了重要成就的领域，属于典型的单细胞培养与操作技术范畴。第八章和第九章分别介绍了细胞工程在植物人工种子生产和遗传种质保存

方面的应用原理与技术,属于离体培养与其它技术综合应用的领域。作为基因工程下游技术的重要环节,从技术上说植物遗传转化体系的建立属于细胞工程的范畴,从应用上讲又是现代生物学各个领域在分子水平上从事研究的重要技术途径。为使读者充分了解本学科技术在遗传转化方面的应用,明确基因工程对作为转基因载体的细胞工程技术的特殊要求,第十章专门介绍了植物遗传转化受体系统的建立。

植物细胞工程的知识体系还需要不断发展和完善。为了方便读者对本书所涉及的科学和技术问题进行更深入的探讨,书中较详尽地列出了所引用资料的来源,其主要部分以参考文献形式列于书后,以便查阅。对于所涉及的专门名词,书中尽可能地附上了相应的英文名称,并以中英文名词对照的形式汇总于书后。由于细胞工程技术的研究和应用目前还受到植物物种和品种的限制,本书还给出了所涉及的植物材料的中文和拉丁文植物学名称,且集录于书后,以供读者参考。

本书由谢从华和柳俊主编,相关高校从事细胞工程教学和科研的中青年教师参加了本书的编写。除此之外,华中农业大学园艺林学学院蔡兴奎博士帮助进行了体细胞杂交一章中部分资料和图片的整理;博士研究生张迟参与了原生质体培养一章中部分示意图的绘制;胡建斌协助收集了有关形态发生的部分资料。同时,本书还被惠许使用了华中农业大学马铃薯实验室的有关图片资料。因此,本书的完稿是集体劳动的结果。

编写国家“十五”规划教材对于编写组来说是一个尝试与挑战,尤其是在生命科学和生物技术快速发展的今天。虽然各位同仁力图将最新的学科进展全面而系统地介绍出来,但受知识、经验和时间的限制,恐挂一漏万;对科学现象的认识亦或木林相淆;在内容和形式上的疏漏也在所难免。我们殷请使用本书的师生和读者不吝指正。

编 者

2003年 7月于武昌

目　　录

绪论 …… 1
第一节　细胞工程在生物技术领域中的地位 …… 1
一、生物技术概述 …… 1
二、细胞工程的概念及研究范畴 …… 2
三、细胞工程与其它相关学科的关系 …… 2
1. 细胞工程学科的建立依赖于相关学科理论的发展 …… 2
2. 细胞工程为生物学研究提供新的实验体系 …… 2
3. 细胞工程必须与其它生物技术相结合才能更好地发挥作用 …… 3
四、细胞工程在现代生物技术中的地位及其实践意义 …… 3
1. 改善农业生产技术 …… 3
2. 保护自然资源，维护生态平衡 …… 3
3. 生物医药开发 …… 4
第二节　植物细胞工程的发展 …… 4
一、植物细胞工程的发展 …… 4
1. 探索阶段 …… 4
2. 培养技术建立阶段 …… 5
3. 应用研究阶段 …… 6
二、我国植物细胞工程的研究进展 …… 7
第三节　植物细胞工程技术的类别及其应用 …… 8
一、植物细胞工程的类别 …… 8
二、植物细胞工程的应用 …… 9
1. 在植物育种上的应用 …… 9
2. 种苗脱病毒与快速繁殖 …… 9
3. 细胞培养生产有用次生产物 …… 9
4. 在细胞生物学和发育生物学研究中的应用 …… 10
5. 在植物遗传、生理生化以及植物病理等基础研究中的应用 …… 10

第一章　细胞全能性与形态发生 …… 12
第一节　细胞全能性及其表达 …… 12
一、细胞全能性概述 …… 12
二、培养条件下的细胞脱分化 …… 14
1. 细胞脱分化过程中的生理活动与细胞结构变化 …… 14
2. 细胞脱分化的调控机理 …… 15
3. 细胞分裂与愈伤组织形成 …… 18

三、细胞分化 …… 19
1. 细胞分化与基因组变化 …… 19
2. 极性与细胞分化 …… 20
3. TE细胞分化及其调控 …… 22
4. 激素在细胞分化中的调控作用 …… 24
第二节 器官发生 …… 26
一、离体培养中器官发生的方式 …… 26
二、器官分化过程 …… 27
三、起始材料对器官分化的影响 …… 28
1. 母体植株的遗传基础 …… 28
2. 外植体的类型 …… 29
四、激素对器官分化的调控 …… 30
五、光照对器官分化的影响 …… 32
六、器官发生的基因调控 …… 32
第三节 体细胞胚发生 …… 34
一、体细胞胚的形成 …… 34
1. 体细胞胚从外植体上直接发生 …… 34
2. 经过愈伤组织的体细胞胚发生 …… 35
3. 细胞悬浮培养的体细胞胚发生 …… 35
二、体细胞胚的结构与发育特点 …… 36
三、影响体细胞胚发生的因素 …… 39
1. 外源激素对体细胞胚发生的调控 …… 39
2. 培养基及培养条件对体细胞胚形成的影响 …… 39
3. 不同基因型间体细胞胚形成能力的差异 …… 40
四、体细胞胚发生的生化与分子基础 …… 41
1. 体细胞胚形成过程中内源生长素的变化 …… 41
2. 体细胞胚发生过程中的特异蛋白质 …… 42
3. 体细胞胚形成的基因表达调控 …… 44

第二章 离体培养下的遗传与变异 …… 46
第一节 离体培养中的遗传与变异特点 …… 46
一、离体培养中的遗传稳定性 …… 46
二、离体培养条件下遗传变异的特点 …… 47
三、影响体细胞遗传与变异的因素 …… 50
1. 供体植物 …… 50
2. 培养基及培养方式 …… 51
3. 继代培养的次数 …… 52
第二节 体细胞变异的细胞遗传学基础 …… 53
一、DNA在核内重复复制 …… 53
二、染色体断裂与重组 …… 54
三、非正常有丝分裂 …… 55

第三节　体细胞变异的分子遗传学基础 …… 55
一、碱基突变 …… 55
二、DNA序列的选择性扩增与丢失 …… 56
三、转座子活化 …… 57
四、DNA甲基化 …… 57
第四节　体细胞无性系变异的诱导与选择 …… 58
一、体细胞无性系变异诱导材料的选择 …… 59
二、离体培养细胞的自发变异 …… 59
三、离体培养细胞的诱变 …… 60
1. 物理诱变 …… 60
2. 化学诱变 …… 60
3. 复合因子诱变 …… 61
4. 转座子插入诱变 …… 61
四、体细胞无性系突变体的筛选 …… 61
1. 直接筛选法 …… 61
2. 间接筛选法 …… 62
五、体细胞无性系变异的利用 …… 63
1. 创造育种中间材料或直接筛选新品种 …… 63
2. 遗传研究 …… 64
3. 发育生物学研究 …… 64
4. 生化代谢途径研究 …… 65

第三章　植物细胞工程技术原理 …… 66
第一节　实验室设置 …… 66
一、实验室组成 …… 66
1. 基本实验室 …… 66
2. 辅助实验室 …… 67
3. 实验室布局 …… 67
二、基本设备配置 …… 68
1. 常规设备 …… 68
2. 灭菌设备 …… 68
3. 无菌操作设备 …… 69
4. 培养设备 …… 69
5. 其它设备 …… 70
三、培养容器与用具 …… 71
1. 培养容器 …… 71
2. 金属用具 …… 71
3. 塑料用具 …… 72
第二节　细胞工程的基本技术 …… 72
一、洗涤技术 …… 72
1. 洗涤剂 …… 72

2 洗涤方法 …… 73
二、灭菌技术 …… 73
1 培养基灭菌 …… 73
2 玻璃器皿灭菌 …… 73
3 金属用具灭菌 …… 74
4 操作环境灭菌 …… 74
第三节 培养基组成及配制 …… 74
一、培养基成分 …… 75
1 无机盐类 …… 75
2 有机化合物 …… 75
3 生长调节物质 …… 76
4 水 …… 77
5 其它附加成分 …… 79
二、培养基配方及培养基选择 …… 79
1 常用培养基配方 …… 79
2 培养基筛选 …… 81
三、培养基配制 …… 81
1 培养基母液配制 …… 81
2 培养基制备 …… 83
第四节 外植体取材及培养条件的控制 …… 83
一、植物材料的培养与外植体取材 …… 83
1 外植体的来源 …… 83
2 供体植株的管理 …… 84
二、外植体灭菌 …… 84
1 种子灭菌 …… 85
2 芽、叶片、茎等组织材料灭菌 …… 85
3 未成熟胚、子房及花药灭菌 …… 85
三、接种培养及其培养条件的控制 …… 86
1 光照 …… 86
2 温度 …… 86
3 培养基 pH …… 87
4 气体调节 …… 87

第四章 植物组织和器官培养 …… 89
第一节 植物脱毒与快速繁殖 …… 89
一、植物脱毒和快速繁殖的意义 …… 89
1 植物脱毒和快速繁殖的概念 …… 89
2 植物脱毒和快速繁殖的意义 …… 89
二、植物脱毒的原理和技术 …… 91
1 基本原理 …… 91
2 植物脱毒的技术规程 …… 92

3. 影响脱毒效果的因素 …… 96
三、离体繁殖 …… 96
1. 离体繁殖的一般技术 …… 97
2. 离体繁殖的使用范围 …… 99
3. 离体繁殖的遗传变异与控制 …… 99
第二节　花药及花粉培养 …… 99
一、基本概念 …… 99
1. 花药培养 …… 99
2. 花粉培养 …… 100
3. 单倍体 …… 101
二、花药培养 …… 101
1. 外植体的选择 …… 101
2. 材料的表面消毒 …… 102
3. 接种 …… 102
4. 培养 …… 102
5. 植株再生 …… 102
6. 生根和移栽 …… 104
三、花粉及小孢子培养 …… 104
1. 取材时期的确定 …… 104
2. 花粉的分离 …… 104
3. 花粉培养方法 …… 105
四、花药和花粉培养中雄核发育的途径及雄核发育诱导 …… 106
1. 花药和花粉培养中雄核发育的途径 …… 106
2. 影响雄核发育的因素 …… 107
3. 雄核发育的诱导 …… 111
五、花药和花粉培养中单倍体植株形成的途径 …… 112
1. 通过胚状体形成单倍体植株 …… 112
2. 通过愈伤组织形成单倍体植株 …… 113
六、花粉植株的倍性及染色体加倍 …… 114
1. 花粉植株的倍性 …… 114
2. 染色体加倍 …… 115
七、花药和花粉培养中的白化苗 …… 115
1. 影响白化苗形成的因素 …… 115
2. 白化苗的细胞学和生理生化特性 …… 116
八、单倍体的应用 …… 116
1. 迅速获得纯合型材料 …… 116
2. 获得育种中间材料 …… 117
3. 突变体选育 …… 117
4. 体细胞融合 …… 117
5. 获得染色体异附加系和代换系 …… 117
6. 遗传研究 …… 118
7. 遗传工程受体 …… 119

第三节 植物胚培养 …… 119
一、植物胚培养 …… 119
1. 胚培养的意义和类型 …… 119
2. 幼胚培养 …… 120
3. 幼胚培养条件 …… 121
二、子房培养 …… 123
1. 材料的选择 …… 123
2. 培养基 …… 124
3. 接种方式 …… 124
4. 单倍体的来源和发育途径 …… 125
三、被子植物胚乳培养 …… 125
1. 概况 …… 125
2. 植物胚乳的发育特性 …… 126
3. 影响胚乳培养的因素 …… 127
4. 胚乳培养的形态发生 …… 128

第五章 植物细胞培养及次生代谢产物生产 …… 130
第一节 悬浮培养 …… 130
一、愈伤组织诱导 …… 130
二、悬浮系的建立与继代培养 …… 131
三、悬浮细胞的生长动态 …… 131
四、悬浮培养细胞的同步化 …… 132
第二节 单细胞培养 …… 134
一、细胞平板培养 …… 134
二、看护培养 …… 135
三、微室培养 …… 135
四、其它单细胞培养技术 …… 136
第三节 植物细胞的规模培养 …… 136
一、概述 …… 136
二、植物细胞规模化培养体系的建立 …… 137
1. 种子细胞的选择 …… 137
2. 种子细胞系的增殖与放大培养 …… 138
3. 大规模培养体系的建立 …… 138
三、生物反应器类型及其特点 …… 139
1. 搅拌式生物反应器 …… 140
2. 气动式生物反应器 …… 141
3. 固定化细胞生物反应器 …… 141
四、植物细胞规模化培养中的有关工程技术问题 …… 143
1. 培养中的植物细胞特性 …… 143
2. 植物细胞培养液的流变特性 …… 143
3. 植物细胞培养过程中的 O_2 与 CO_2 调节 …… 143

4. 泡沫和表面黏附性 …… 144
5. 剪切力对植物细胞的影响 …… 144
第四节　培养细胞的次生代谢及产物积累 …… 145
一、植物次生代谢产物的主要类型 …… 145
1. 酚类化合物 …… 145
2. 萜类化合物 …… 145
3. 含氮化合物 …… 145
4. 其它 …… 146
二、培养条件下的植物细胞次生产物积累的特性 …… 146
三、提高细胞次生产物产量的途径 …… 147
1. 选择适宜的起始材料 …… 147
2. 培养基成分的影响 …… 147
3. 前体的应用 …… 148
4. 激发子的应用 …… 148
5. 培养技术的选择 …… 149

第六章　原生质体培养 …… 151
第一节　原生质体研究概况 …… 151
第二节　原生质体分离 …… 153
一、材料的选择 …… 153
二、酶 …… 154
三、渗透压稳定剂 …… 155
四、原生质体的游离 …… 156
1. 材料的预处理 …… 156
2. 酶解处理 …… 156
五、原生质体的纯化 …… 157
1. 沉降法 …… 157
2. 漂浮法 …… 157
3. 梯度离心法 …… 157
六、原生质体活力的测定 …… 157
1. 荧光素双醋酸酯 (fluorescein diacetate, FDA) 染色法 …… 157
2. 酚藏花红 (phenosafranine) 染色法 …… 158
3. 荧光增白剂 (calcofuor white, CFW) 染色法 …… 158
4. 伊凡蓝 (Evans blue) 染色法 …… 158
第三节　原生质体培养 …… 158
一、培养基 …… 159
1. 无机盐 …… 159
2. 渗透压稳定剂 …… 159
3. 有机成分 …… 160
4. 激素 …… 160
5. pH …… 160

二、原生质体培养方法 …… 162
1. 液体浅层培养法 …… 162
2. 悬滴培养法 …… 162
3. 微滴培养法 …… 163
4. 固体平板法 …… 163
5. 液体浅层 —固体平板双层培养法 …… 163
6. 琼脂糖珠培养法 …… 163
7. 饲养层培养法 …… 164
8. 原生质体培养体系的优化 …… 164
三、植板密度 …… 166
四、培养条件 …… 166
1. 光照 …… 166
2. 温度 …… 166
五、原生质体的发育和植株再生 …… 167
1. 细胞壁再生 …… 167
2. 细胞分裂和生长 …… 167
3. 植株再生 …… 167
第四节 原生质体再生植株的遗传性状及变异 …… 168
一、再生植株的倍性及染色体数目和结构的变异 …… 168
二、再生植株的遗传性状及变异 …… 169
第五节 性细胞原生质体培养进展 …… 169
一、花粉原生质体 …… 170
1. 花粉原生质体的分离 …… 170
2. 花粉原生质体的培养 …… 171
二、配子原生质体 …… 172
1. 配子原生质体的分离 …… 172
2. 配子原生质体的培养 …… 173
第六节 原生质体培养的生理问题 …… 174
一、逆境反应 …… 174
二、修复机理 …… 174
三、脱分化 …… 174
四、细胞分裂与分化 …… 175
五、再生细胞壁 …… 175
六、原生质体出芽 …… 175
七、内吞作用和液泡 …… 176
八、气孔生理 …… 177
第七节 原生质体培养的应用 …… 178
一、基础理论研究的实验系统 …… 178
二、体细胞杂交 …… 178
三、作为遗传转化的受体 …… 179
四、无性系变异及突变体的筛选 …… 179

五、分离细胞器的理想材料 …… 179

第七章　植物体细胞杂交 …… 180
第一节　植物体细胞杂交的概念 …… 180
一、植物原生质体融合技术的发展 …… 180
二、植物细胞杂交的类型 …… 181
1. 植物细胞杂交的类型 …… 181
2. 原生质体融合的种类 …… 182
第二节　原生质体融合 …… 183
一、融合方法 …… 183
1. PEG诱导融合法 …… 183
2. 电融合法 …… 185
二、原生质体的融合过程 …… 186
三、影响原生质体融合的因素 …… 186
第三节　杂种细胞的选择和体细胞杂种的鉴定 …… 186
一、原生质体的融合产物 …… 186
二、杂种细胞的选择系统 …… 187
1. 互补选择法 …… 187
2. 机械选择法 …… 189
3. 组织培养筛选法 …… 190
三、杂种植株的鉴定 …… 190
1. 形态学鉴定 …… 190
2. 细胞学鉴定 …… 191
3. 生化分析 …… 191
4. 分子生物学方法 …… 192
四、体细胞杂种的遗传特性 …… 192
1. 细胞分裂与染色体丢失 …… 192
2. 基因转移与性状表达 …… 193
3. 体细胞杂种在遗传上的不稳定性 …… 193
第四节　细胞质杂种 …… 193
一、细胞质杂种概念 …… 193
二、细胞质杂种产生的途径 …… 194
第五节　原生质体的遗传饰变 …… 194
一、细胞核移植 …… 194
1. 细胞核的分离 …… 194
2. 细胞核的移植 …… 195
二、叶绿体移植 …… 195
1. 叶绿体的分离 …… 196
2. 叶绿体的移植 …… 196
三、染色体的摄取 …… 197
1. 染色体的分离 …… 197

2 染色体的摄取 …… 197
四、外源 DNA的摄取 …… 198
五、微生物移植 …… 198
第六节 体细胞杂交技术的应用 …… 199
一、通过体细胞杂交合成新物种 …… 199
二、通过体细胞杂交培育作物新种质和新品种 …… 200
三、通过体细胞杂交转移细胞质基因控制的性状 …… 200
第七节 体细胞杂交研究的展望与局限性 …… 202
一、体细胞杂交研究的展望 …… 202
二、体细胞杂交研究的局限性 …… 203

第八章 人工种子 …… 205
第一节 人工种子的概念 …… 205
第二节 繁殖体的类型及其生产 …… 208
一、不同类型繁殖体比较 …… 208
1 诱导培养方式 …… 208
2 不同繁殖体成苗率比较 …… 208
二、繁殖体的生产 …… 211
1 体细胞胚的规模化生产 …… 211
2 微型营养变态器官繁殖体的培养 …… 212
3 芽繁殖体的培养 …… 214
第三节 人工种子包被 …… 214
一、繁殖体的预处理 …… 215
二、繁殖体的包埋 …… 215
三、人工种皮的研制 …… 216
第四节 人工种子的发展和应用前景 …… 218
一、微器官人工种子可能最先用于无性繁殖植物 …… 218
二、人工种子可用于天然种子繁殖后代群体变异大的植物 …… 218
三、以体细胞胚为繁殖体应用的可能性及需要注意的问题 …… 219

第九章 植物种质资源离体超低温保存 …… 220
第一节 概述 …… 220
一、植物种质资源低温保存的重要性 …… 220
二、超低温保存的概念 …… 221
三、超低温保存的研究概况 …… 221
1 超低温保存技术的发展 …… 221
2 用于离体超低温保存的植物材料 …… 222
3 超低温保存的植物种类 …… 222
第二节 植物材料超低温冻存的细胞学基础 …… 223
一、细胞内外水的冻结状态是细胞冻存技术的关键 …… 223
二、植物细胞超低温保存过程中的致死损伤 …… 224

第三节　超低温保存的方法 …… 224
一、传统的降温冰冻方法 …… 224
1 快速冰冻法 …… 224
2 慢速冰冻法 …… 225
3 两步法 …… 225
4 逐级冰冻法 …… 225
二、玻璃化保存方法 …… 225
1 玻璃化法 …… 226
2 包埋玻璃化法 …… 227
三、其它超低温冻存方法 …… 227
1 干燥法 …… 227
2 预培养法 …… 227
3 预培养 —干燥法 …… 227
4 包埋脱水法 …… 228
第四节　影响超低温保存效果的主要因素 …… 229
一、材料的基本特性 …… 229
二、预培养和低温锻炼 …… 230
三、冰冻保护剂的应用 …… 230
四、化冻方法 …… 232
五、再培养 …… 232
第五节　超低温保存过程中的遗传变异及其检测技术 …… 232

第十章　植物基因转化受体系统 …… 234
第一节　植物基因转化受体系统的条件 …… 234
一、高效稳定的再生能力 …… 234
二、较高的遗传稳定性 …… 235
三、具有稳定的外植体来源 …… 235
四、抗生素敏感性 …… 235
五、农杆菌敏感性 …… 236
第二节　植物基因转化受体系统的类型及其特性 …… 236
一、经过愈伤组织的受体系统 …… 236
二、不经过愈伤组织的受体系统 …… 237
三、原生质体再生系统 …… 237
四、细胞系及其体细胞胚受体系统 …… 238
五、生殖细胞受体系统 …… 238
第三节　植物基因转化受体系统的建立 …… 239
一、高频再生系统的建立 …… 239
1 外植体的选择 …… 239
2 培养基选择 …… 240
二、抗生素敏感性 …… 241
三、农杆菌敏感性试验 …… 242

第四节 受体系统常见的问题及其解决途径 …… 242
一、再生能力及其遗传稳定性 …… 242
二、愈伤组织褐化 …… 243
三、再生植株玻璃化 …… 243
四、影响受体系统转化效率的因素 …… 243
1. 农杆菌菌株 …… 243
2. Vir基因活化的诱导物 …… 244
3. 外植体的类型和生理状态 …… 244
4. 外植体的预培养 …… 244
5. 外植体的接种及共培养 …… 244
6. 转化细胞的选择培养和转化植株再生 …… 245

主要参考文献 …… 247
中英文名词对照 …… 273
植物学名称对照 …… 278

绪　　论

第一节　细胞工程在生物技术领域中的地位

一、生物技术概述

生物技术一词来自英文复合单词 biotechnology。英文前缀 bio表示生物学过程的利用，而 technology则表示用以解决问题或制造新产品的技术，因此生物技术的基本定义是利用生物学过程解决人类生存和发展所面临的问题。

人类利用生物学过程始于万年以前，早在公元前 8000年，人类就已开始驯化动植物，马铃薯在那个时代就已开始作为食用作物栽培，这是最早的原始生物技术应用的例子。而 19世纪法国微生物学家巴斯德揭示了发酵原理，从此开始了以微生物发酵技术为特征的近代生物技术的研究和利用。而随着 20世纪 60年代，尤其是 70年代以来人们对生命活动过程认识的不断深入，人类已开始能够利用除整个生物个体以外的更小的生物器官、组织、细胞，甚至是分子的生物学过程，这样就赋予了生物技术定义的新的内涵，且在发展阶段上称现在的生物技术为现代生物技术，它是在分子生物学和细胞生物学基础上结合现代工程学的方法和原理而发展起来的一门综合性科学技术，是一个复杂的由多学科相互渗透融合所形成的新学科。

关于生物技术的定义，常因研究领域不同而有所差异。多数学者认为，生物技术是以生物科学为基础，利用生物个体或生物器官、组织、细胞的特性和功能，设计构建具有预期性状的新物种或新品系（包括细胞系），以及与工程原理相结合进行产品加工生产的综合性技术体系。由此可见，生物技术的内涵主要是：运用现代生物学理论与科学技术改造细胞的遗传物质，培育出人们需要的生物新品种；工业规模地利用现有生物体系，制备生物产品；模拟生物体系，以生物化学工程代替化学工程，制备工业产品；发展相应的科学理论与工程技术。其主要技术范畴包括基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程以及生化工程。

现代生物技术始于 20世纪 70年代，现代生物科学的迅速发展，在分子、亚细胞、细胞、组织和个体等不同水平层次上揭示了生物结构和功能的关系，从而使人们得以运用生物学的方法以及现代工程学所开拓的新技术和新工艺，对生物体进行不同层次的设计、控制、改造或模拟，构成了巨大的生产力。不仅生物技术领域的研究日新月异，生物技术产业也可谓一日千里，成为代表着 21世纪发展方向、具有远大发展前景的新型产业。据世界经济合作与发展组织（Organisation for Econonic Co-operation and Development, OECD）的报告（van Beuzekom, 2001），世界转基因作物的种植面积在 1996年为 280万 hm^2，到 2000年就增至 4 420万 hm^2。2000年，美国 54%的大豆、25%的玉米、56%的棉花面积种植的是遗传工程品种（genetically engineered varieties）。据生

物技术产业组织（Biothechnological Industry Organisation, BIO）统计，1998—2002年，全世界有32 500万人使用过由美国食品与药物管理局（U. S Food and Drug Administration, FDA）许可的155种生物技术药物和疫苗，且市售的生物技术药物中有70%是在过去6年中批准生产的（BIO, 2003a）。生物技术产品的贸易额在2003年4月中旬达到了2 060亿美元，生物技术产业的收入也由1992年的80亿美元快速增长至2001年的348亿美元。生物技术已在农业、医药、轻工业、食品、环保、海洋及能源等多方面广泛应用。同时，一大批以生物技术为依托的新型产业也正在迅速形成（BIO, 2003b）。

现代生物技术的最大特征是多学科性。现代生物技术的产生和发展涉及许多学科的理论和技术进步，包括分子生物学、细胞生物学、生物化学、遗传学、微生物学、动物学、植物学、工程学、电子学和计算机科学等基础学科和应用学科。此外，现代生物技术的另一个特征是它的商业性。生物技术的最终目标是生物产品，因此，与其它学科研究不同，现代生物技术的发展在某种程度上说是由经济基础和社会要求所推动的。继Genentech公司1982年被正式批准生产和销售世界上第一种基因工程蛋白药物——重组胰岛素以来，人们对现代生物技术的投资热情日益高涨，进一步促进了现代生物技术的产业化进程。

二、细胞工程的概念及研究范畴

细胞工程（cell engineering）是应用细胞生物学和分子生物学方法，借助工程学的实验方法或技术，在细胞水平上研究改造生物遗传特性和生物学特性，以获得特定的细胞、细胞产品或新生物体的有关理论和技术方法的学科。广义的细胞工程包括所有的生物组织、器官及细胞离体操作和培养技术。狭义的细胞工程则是指细胞融合和细胞培养技术。

根据研究对象不同，高等生物的细胞工程可分为动物细胞工程和植物细胞工程。动物细胞工程包括细胞培养技术（包括组织培养、器官培养），细胞融合技术，胚胎工程技术（核移植、胚胎分割等），克隆技术（单细胞系克隆、器官克隆和个体克隆）。植物细胞工程包括植物组织、器官培养技术，细胞培养技术，原生质体融合与培养技术，亚细胞水平的操作技术等。

三、细胞工程与其它相关学科的关系

细胞工程是生物技术的重要组成部分，细胞工程既是一门相对独立的学科，同时又与其它生物学科有着紧密的联系。

1. 细胞工程学科的建立依赖于相关学科理论的发展

细胞工程的重要理论基础是细胞生物学、分子生物学和生物化学。可以说，没有这些基础学科理论的指导，就不可能建立细胞工程学科。只有对生物细胞的结构、机能以及发育特性等有了深入的了解，才有可能对其进行控制培养。只有在对细胞遗传物质本质具有清楚认识的前提下，才有可能对其进行定向改造。而这一切均取决于相关基础学科的发展水平。此外，现代化学工程、应用物理以及电子学的理论和技术，在细胞工程实验技术体系的建立中也起到了重要的指导作用。当然，从事细胞工程学领域的工作还必须具备遗传学、微生物学、动物学及植物学等基础学科的知识，因为它们是一切生物科学的基础。

2. 细胞工程为生物学研究提供新的实验体系

细胞培养技术使多细胞生物的单细胞生命活动研究成为可能，从而促进了人类对生命活动

本质的认识。细胞融合、核移植等技术为人类定向改造生物遗传性状提供了有效技术途径。植物离体培养技术使人们可以在人工控制和模拟条件下对植物进行研究和改造，这不仅免除了自然环境中不可预测性因素的干扰，还可大大缩短研究周期，从而加速了相关学科的研究进程。

3. 细胞工程必须与其它生物技术相结合才能更好地发挥作用

细胞工程是一个综合性的实验技术体系，它的每一项技术均要涉及其它有关领域。因此，细胞工程的研究和利用绝不可能是单一的、孤立的。一方面它需要相关技术的协作和补充（如通过细胞培养生产有效次生产物，需要与生化工程相结合），另一方面它亦可能是其它生物技术的一个必不可少的环节（如基因工程的下游工程基本上是属于细胞工程的范畴）。

不仅如此，细胞工程还应与传统的育种技术、相关的加工技术等相结合才能加速其应用步伐，使其更好地为人类服务。

四、细胞工程在现代生物技术中的地位及其实践意义

现代生物技术是典型的高技术密集型的综合技术体系。一个生物技术产品或技术的形成，往往需要涉及生物学、信息学、工程学等多学科领域知识和技术的应用。同时，细胞工程本身作为生物技术的重要组成部分，在现代生物技术领域中也发挥着技术载体和桥梁的作用，是现代分子技术向产品过渡的中间链接技术，比如经分子重组技术改良后的基因，必须通过细胞工程的途径，才能培养成新个体或生产新产品。

另外，细胞工程技术亦可作为独立的生物技术在现代生物学研究与应用中发挥重要作用，如利用植物离体快速繁殖技术大量生产健康种苗，已在无性繁殖中获得广泛应用；离体培养中体细胞胚胎发生，已成为植物胚胎发育研究的重要实验体系等。

1. 改善农业生产技术

“民以食为天”，粮食安全是人口持续增长的21世纪人类所必须解决的首要问题。1900年世界总人口为16亿，2000年为53亿，按目前的增长速度，到2030年将达到100亿。联合国粮农组织预测，要满足人口增长对食物的需求，2030年的粮食产量必须在现有基础上增加一倍。然而，全球的耕地面积却在逐年减少，农业生态环境也在不断恶化。因此，如何利用有限的农业资源养活更多的人口，将是一个长期而艰巨的任务。其中最有效的方法是培育优良的农作物新品种，提高单位面积的粮食产量。而细胞工程技术能有效地利用远缘有利基因，或创造遗传变异，或作为基因工程和传统育种方法的桥梁，从而大大加快育种步伐，为植物育种开辟新的生物技术途径。此外，利用细胞工程技术对优良品种进行大量快速的繁殖，实行农业生产工业化，不仅能大大加快新品种的应用速度，同时还可以节约耕地、提高种子质量，这一领域已经或正在形成一个新型的高新技术产业。可以相信，这一技术必将在未来农业中发挥巨大作用。

动物细胞工程技术与植物细胞工程技术一样，在动物品种改良中具有广阔的应用前景，特别是与动物胚胎工程、基因工程等相结合，它将在动物品质改良、性别控制等领域实现广泛的应用，为人类提供优质高产的动物食品。

2. 保护自然资源，维护生态平衡

在我们日常生产生活中，许多产品传统上均依赖于化学工业生产，如农药、医药等，这些传统的化学工业往往带来环境污染，同时消耗大量的资源和能源。而以细胞工程技术为主体的新型生物工业，可以代替传统的化学工业，从而有效地保护生态环境。近年来，应用细胞工程技术生

产的生物农药、天然轻化工产品、天然药物已有许多成功的报道,有的已投入大规模生产,如日本的紫草宁细胞工业化生产。Phyton公司利用红豆杉细胞培养生产紫杉醇等。Bt等生物农药已在全球广泛应用,有效地减少了化学农药对环境和健康带来的负面影响。我国在人参皂甙、长春花碱、紫杉醇等产物的细胞生产研究中亦取得长足进步。利用细胞工程生产天然产物,不仅避免了工业污染,同时减少了因从自然资源中提取天然产物而带来的资源破坏,因而也有利于自然资源的保护。

3. 生物医药开发

利用细胞工程技术不仅可以生产天然产物,它与基因工程相结合还可以开发制造新型的医药产品。利用动物细胞生产人必需的各种生物活性物质,可以满足某些有相应缺陷症的病人的需要;利用单克隆技术生产各种诊断试剂盒,可用于疾病的快速诊断;利用动、植物作为生物反应器可以生产廉价的疫苗等。目前,这一领域已成为世界各国新型医药产业的重点,美国大约每年以15%左右的幅度递增。到2003年4月,已有370多个品种的生物医药产品被美国食品和药物管理局批准用于200多种疾病的临床诊断和治疗(BIO, 2003b)。

第二节 植物细胞工程的发展

一、植物细胞工程的发展

植物细胞工程是一门以植物组织和细胞的离体操作为基础的实验性学科,对于植物细胞工程的定义和范围,目前还没有一个统一的标准。一般认为,以植物组织细胞为基本单位,在离体条件下进行培养、繁殖或人为的精细操作,使细胞的某些生物学特性按人们的意愿发生改变,从而改良品种或创造新物种,或加速繁殖植物个体,或获得有用物质的过程统称为植物细胞工程。植物细胞工程是在植物组织培养的基础上发展起来的,因此,植物细胞工程亦是广义概念上的植物组织培养。

如前所述,植物细胞工程作为一门技术学科是在植物组织培养技术的基础上发展和完善起来的。因此,它的发展历史实际上也就是植物组织培养的发展历史,其发展过程可以大致划分为3个阶段。

1. 探索阶段

在这一阶段中,细胞学说的产生和细胞全能性学说的提出为组织培养技术的产生奠定了理论基础。在这些理论的指导下所开展的有关实验,对组织培养技术的建立进行了有益的探索。

细胞学说(cell theory)是Schleiden和Schwann分别于1838年和1839年提出的,其核心内容是:细胞是有机体,亦是生物体的基本结构单位,由它构成整个生物个体。同时,植物细胞又是在生理和发育上具有潜在全能性的功能单位。随后,Schwann在1839年更明确地指出:"如果具有与有机体内一样的条件时,每个细胞应该可以独立生活和发展"。这一论点已成为组织培养研究的思想基础。

细胞全能性学说是德国著名植物学家G. Haberlandt在细胞学说的基础上于1902年提出的。他认为,高等植物的组织、器官可以不断分割,直到单个细胞。如果每个细胞都有植物个体一样

的性质和能力，那么，可以通过植物细胞培养使单个细胞发育成为一个新个体。为了论证这一观点，G. Haberlandt对高等植物的叶肉细胞、髓细胞、腺毛细胞、气孔保卫细胞和表皮细胞等材料进行了离体无菌培养，虽然某些细胞存活了很长时间，但始终没能发生细胞分裂和增殖。G. Haberlandt实验失败的原因有两点：一是取材不当；二是培养基中不含诱导激素（当时还没发现生长激素）。然而，作为植物组织培养的先驱者，G. Haberlandt的贡献不仅在于首次进行了离体细胞培养实验，而且在其1902年发表的《植物离体细胞培养实验》的报告中，还提出了胚囊液在组织培养中的作用和看护培养法等可行性的预见。

此后，Hanning在1904年进行萝卜和辣根菜的胚培养时，发现离体胚可以充分发育，并且提前萌发形成小苗，这是世界上胚胎培养最早获得成功的一例。1922年，Kotte和Robbins分别报道了根尖离体培养获得成功的实验。Laibach于1925年通过培养亚麻种间杂种幼胚，成功获得了种间杂种。1933年，我国的李继侗等进行了银杏离体胚培养，发现3mm以上大小的胚即可正常地生长成小植株，并发现胚乳提取物能促进银杏离体胚的生长。在这一时期，一些植物的幼胚培养获得了成功，离体器官培养有了一定进展。

2. 培养技术建立阶段

作为一门技术，它必须具有一定的程序性。也就是说，它应该具有一定的技术模式。从20世纪30年代开始至50年代末期，植物组织培养建立了两个与培养技术有关的重要模式：一是培养基模式；二是激素调控模式。它们的建立是许多科学家长期研究的结果，现将其中具有重要影响的代表人物和实验分述于下。

White于1934年以番茄根为外植体建立了第一个活跃生长的无性系，使根的离体培养实验首次获得成功。1937年，他又发现了B族维生素在离体培养中的作用，从而产生了由无机盐与有机成分组成的White培养基，并且建立了植物根的离体培养技术。

Gautheret于1934年在山毛柳和黑杨等形成层组织的培养中均发现B族维生素和IAA（indole－3－acetic acid，吲哚乙酸）在形成层培养中的作用。1939年，他在添加B族维生素和IAA的培养基上连续培养胡萝卜根的形成层获得首例成功。

Nobecourt在1938年以胡萝卜根为外植体，在固体培养基上培养诱导形成了愈伤组织。

由于上述著名的科学研究，White、Gautheret和Nobecourt一起被誉为植物组织培养的奠基人。他们的贡献在于：建立了植物组织培养的综合培养基，它包括无机盐、有机物和生长激素，发现了B族维生素在组织培养中的作用，基本建立了植物组织培养技术。我们现在所用的若干培养方法和培养基，原则上都是这3位科学家所建立的方法和培养基的演变。

Skoog和崔澄于1951年发现，腺嘌呤或腺苷不但可以促进愈伤组织的生长，而且还能解除IAA对芽的抑制作用，诱导芽的形成，从而确定了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根形成的主要条件之一。

Skoog和Miller于1957年进一步提出了有关植物激素控制器官形成的概念。他们发现，在烟草髓组织培养中，根和茎的分化是生长素对细胞分裂素比率的函数，通过改变培养基中这两类生长调节物质的相对浓度可以控制器官的分化。当生长素／细胞分裂素比率高时促进生根，比率低时则促进芽的分化，比率平衡时则有利于愈伤组织的生长。

Reinert(1959)、Steward和Shantz(1959)分别报道，在胡萝卜愈伤组织培养中形成了体细胞胚。这是一种不同于通过芽和根的分化而形成植株的再生方式。

至此,植物组织培养技术已基本建立起来。

3. 应用研究阶段

20世纪 60年代以后,由于组织培养技术日趋完善和成熟,对组织培养中细胞生长和分化规律的认识也不断深入。同时,由于组织培养不受季节限制,具有实验周期短、实验环境可控制性强等优点,使其得以迅速发展,其发展特点可以概况为以下几个方面。

其一,组织培养领域的研究迅速在世界各国的有关实验室广泛展开。据统计,在 20世纪 60年代初期,全世界还只有十几个国家的少数实验室从事组织培养研究。但到了 20世纪 70年代,组织培养研究已普及到世界各国,没有开展此项研究的国家已经很少。20世纪 70年代末以后,几乎所有从事生物科学研究的单位均组建了组织培养实验室,其发展和普及速度是任何其它领域都不能比拟的。

其二,技术体系更加完善。这一阶段的技术体系包括:根据不同的培养目的外植体的取材和灭菌方法,不同外植体及其培养产物的培养程序,适合于不同植物种类和外植体类型的培养基等。在这一阶段中,由于控制细胞分化的需要,对培养基、激素、营养条件和培养方法都进行了大量的研究,产生了 MS、B5、Nitsch、LS、N6等用于不同组织培养类型的培养基,也建立了各种培养方法,如平板培养法、微室悬滴培养法、看护培养法等多种特殊培养方法。

其三,形成了较为完整的理论体系。在植物组织培养研究的基础上,植物细胞工程现已形成了以细胞全能性为基本理论基础,以细胞脱分化和再分化调控为中心的理论体系。并且,随着分子细胞生物学研究的不断深入,对细胞脱分化与再分化的调控机理的研究,已从早期的现象观察、简单的培养成分调控深入到了细胞内分子调控的水平,从而从本质上揭示了细胞全能性的表达机理。

其四,研究目的性更加明确,并已广泛应用到生物科学研究的各个领域,以细胞工程为基础的新型生物技术产业正在兴起。

1952年,Morel和 Martin首次证实,通过茎尖分生组织的离体培养,可以由已受病毒侵染的大丽花中获得无毒植株。1960年,Morel提出并建立了第一个离体繁殖兰花种苗的方法,很快在兰花生产中广泛使用。现在,Morel建立的脱毒技术和离体繁殖技术已广泛用于多种作物无毒苗生产,如甘蔗、草莓、马铃薯等。植物离体快速繁殖技术已在许多植物的种苗繁殖上实现了农业生产的工业化。

1964年,Guha和 Maheshwari采用曼陀罗花药培养首次获得成功,引起了植物育种学家们的广泛兴趣,因为由此而获得的单倍体在植物育种中有着广泛的应用潜力。随后的 10多年中,数十种植物通过花药培养获得成功。我国 20世纪 70年代末 80年代初通过花药培养还培育出水稻、小麦、烟草等作物新品种并用于生产。

1971年,Takebe等在烟草上首次由原生质体获得了再生植株,从而促进了体细胞融合技术的发展。1972年,Carlson等通过两个烟草种间原生质体的融合,获得了第一个体细胞杂种,这为克服远缘杂交不亲和找到了新的途径。因而,20世纪 70年代以后,这一领域的研究十分活跃。现在,这一技术已在许多作物中与常规育种相结合,使相关的野生资源得以有效应用。

此外,单细胞培养、细胞悬浮培养等技术的建立,为研究植物细胞代谢提供了有效的实验体系,现已成为植物生理研究的重要手段。利用植物细胞连续培养,生产有用次生产物,亦是极具潜力的应用领域。以细胞大规模培养技术为依托的新型轻化工、医药产业正在蓬勃发展。细胞

工程的各种技术同时也成为现代生物学研究的必备手段和桥梁。

二、我国植物细胞工程的研究进展

我国植物细胞工程领域的研究工作起步于 20世纪 70年代初,通过几十年的研究,已形成鲜明的特点。在研究和发展植物细胞工程理论和技术的同时,细胞工程在植物改良及相关领域的应用也取得了许多令人注目的成就。

我国花药培养和单倍体育种研究处于国际前列,这一领域的主要成就体现在培养基的改进和单倍体的应用中。1975—1978年期间,朱至清等在水稻花药培养中观察到,培养基的氨离子浓度是禾本科作物花药培养的限制因子之一。高浓度的氨离子可能抑制花粉细胞分裂及其进一步的生长发育,低浓度的氨离子则能与硝态氮结合,促进花粉胚的形成。他们据此建立的 N6培养基不仅广泛地用于禾本科植物的花药和花粉培养,而且现在已成为国内外禾本科作物各类离体培养的通用培养基。

利用花粉单倍体培育新品种的技术途径在我国首先得以应用。我国科学家采用花药培养技术已在水稻、小麦、油菜、大麦和甜椒等作物上培育出了许多新品种。李梅芳等育成的水稻粳稻中花 6、8、9、10、11、12号等花培系列品种,累计推广面积达 70万 hm^2。胡道芬等培育的小麦品种京花 1、3、5号,1994年统计累计推广面积也达 62万 hm^2。陈正华等与云南生物技术研究所合作选育的低芥酸、低硫甙 (双低) 油菜 H165和 H166,华中农业大学吴江生等培育的华油一号等油菜新品种,其推广面积均达到 10多万 hm^2。此外,一些通过花药或花粉培养途径选育的大麦、甜椒等新品种也已在生产上推广应用。利用花粉植株筛选的染色体代换系、附加系等,已在小麦、大麦以及一些茄科植物中广泛应用,从而大大提高了远缘育种的效率,成为染色体工程的重要辅助手段。

我国从 20世纪 70年代开始引进和推广植物脱毒和快繁技术,1981—1985年期间建立了马铃薯和甘蔗的脱毒试管苗生产技术体系,并将其应用于种苗生产。以马铃薯茎尖脱毒为基础的马铃薯脱毒种薯生产体系研究在我国也取得了长足发展。目前的马铃薯脱毒种薯体系已从依托于脱毒试管苗发展到依托于脱毒试管薯,华中农业大学研究的试管薯生产技术在国内外率先进入了产业化生产阶段。从 1986年到 20世纪 90年代初,脱毒和快繁技术已扩大应用到许多果树和多年生林木,如香蕉、柑橘、苹果、葡萄、桉树和毛白杨等植物,在一些花卉植物上也已开始研究利用。与此同时,各种病原体检测技术也得到相应发展。据不完全统计,到 2001年,我国组培快繁研究所涉及的植物已达上百种,包括作物、花卉、果树、蔬菜、林木以及药用植物。更为欣喜的是,一些依脱于植物脱毒快繁技术的现代农业企业正在兴起,使我们看到了一个农业生产工业化的现代农业前景。

到 20世纪 90年代中期,全世界大约有 180种植物的原生质体培养再生植株获得成功,其中约 50种由我国首次报道,包括许多重要农作物如棉花、大豆、蚕豆、花生、高粱和玉米等。随着原生质体培养体系的建立和完善,细胞融合研究相继在一些研究单位和大专院校开展起来,并取得了一些重要成果。除了成功获得一大批远缘体细胞杂种外,细胞融合技术近年来已在一些重要经济作物的育种中得以应用。如陈惠民、夏光敏等在小麦原生质体再生植株及培养条件优化的基础上,开展了小麦与异属植物的体细胞杂交,通过 UV—融合技术已将高冰草优质、耐盐性状转入了小麦,创造了多种新种质和新品系。邓秀新等在创建柑橘原生质体培养体系的基础上,又

建立了柑橘对称和不对称融合实验程序,并通过此技术获得了一批柑橘不同种、属的远缘细胞杂种。李耿光、戴朝曦等先后通过细胞融合成功地将马铃薯野生种的抗原导入栽培种中。华中农业大学马铃薯实验室近年来通过细胞融合,已获得几十个抗马铃薯青枯病的远缘细胞杂种。目前,体细胞杂交技术已作为重要的育种途径在多种作物中应用。

此外,植物体细胞人工种子、植物细胞规模培养生产次生产物等领域的研究也取得了一定的进展。郭仲琛、陈正华等在西洋参、石刁柏、芹菜和桉树等多种植物中开展了人工种子研究。近年来,中国科学院遗传研究所研制的桉树微芽人工种子已进入田间实验,至今已有 5年树龄。利用离体培养中营养变态器官作为人工种子的研究也在马铃薯、百合、莲藕等植物中取得重要进展,其中马铃薯试管块茎种子已形成批量生产的技术体系,进入田间应用阶段。我国利用细胞悬浮培养体系大规模培养植物细胞的研究虽然起步较晚,但现已在紫草、人参、长春花、红豆杉和三七等植物的细胞培养和次生产物生产中取得了重要成就。

综上所述,植物细胞工程在我国的研究尽管历史不长,但其研究领域涉及细胞工程的各个方面,无论是在技术研究上,还是在品种改良和繁殖的应用上,基本保持了与国际同步发展的水平,甚至在某些领域还处于先进水平。同时也应该看到,我国在细胞工程的基础理论研究方面还十分薄弱,与世界同类研究相比还存在较大的差距。我们应在进一步发展现有技术的同时,重视相关基础理论研究,加强与有关学科的交叉融合,使植物细胞工程得以进一步发展,为其应用提供更广阔的空间。

第三节 植物细胞工程技术的类别及其应用

一、植物细胞工程的类别

植物细胞工程是以培养技术为基础,结合工程技术策略和相关操作的综合性实验体系。因此,根据培养层次、取材以及工程技术的差异或侧重点不同,植物细胞工程可以分为不同的类别。

根据培养层次的不同可分为:a.植株培养,即通常的试管小植株培养,如从植株到植株的继代繁殖;b.器官培养,包括茎尖、根茎、叶、花 (包括花器官的各部位如花药)及幼嫩果实等类型的培养;c.胚胎培养,包括胚、胚乳、胚珠和子房等培养;d.愈伤组织培养,即经植物各种外植体培养形成的愈伤组织培养;e.细胞培养,大多指具有良好分散性的单细胞及小细胞团的悬浮培养,包括花粉小孢子悬浮培养,同时也包括各种固体或半固体的单细胞培养;f.原生质体培养,植物细胞脱除细胞壁后的完整细胞培养即为原生质体培养。

根据工程技术策略的不同可分为:a.组织与细胞培养,包括上述所有培养类型;b.细胞融合,即原生质体融合,是获得体细胞杂种的技术途径;c.胚胎工程,包括试管受精、以性细胞为基础的其它操作等;d.染色体工程,包括染色体替换、切割等;e.细胞遗传工程,包括通过细胞培养途径的各种外源遗传物质的摄入、体细胞突变和细胞器操作等。

此外,按照在植物领域应用目的的不同,细胞工程还可分为植物快速繁殖的培养技术,获得特殊倍性的细胞工程技术,获得特殊杂种的细胞工程技术以及用于基因功能研究的细胞工程技术等。

二、植物细胞工程的应用

植物细胞工程有着广阔的应用前景,这一点已为近年来日益增多的实际范例所证实。就目前已经取得成效的领域来看,大致有以下几个方面。

1. 在植物育种上的应用

将常规植物育种技术与植物组织培养技术相结合,可以获得常规技术难以获得或无法获得的种质材料,缩短育种周期,提高育种效率。

⑴ 快速获得特殊倍性材料　采用花药和花粉培养可以很快获得单倍体。单倍体经过加倍即可获得纯合材料,从而可以大大缩短育种周期。利用胚乳培养技术还可以获得三倍体,能够用于一些希望果实无核的瓜、果植物育种中。

⑵ 克服远缘杂交不亲和　采用原生质体融合技术可以获得亲缘关系相差很远的两亲本间的细胞杂种,不仅可以克服远缘杂交不亲和,而且有可能创造新物种。

⑶ 克服杂种胚早期夭折　远缘杂种胚和某些果树如柑橘、早熟桃等的胚常常早期夭折,利用幼胚培养技术就可以加以克服。

⑷ 导入外源基因　用细胞工程技术可以进行细胞器转移、基因转移、染色体转移等,从而实现外源基因的导入。

⑸ 突变体筛选　在细胞培养和原生质体培养中,时常会发生各种自发的遗传变异,这是十分广泛的变异来源。同时,在细胞和原生质体水平上的人工诱变,其变异频率将会大大提高,为突变体的筛选提供了更多的机会。

⑹ 种质资源保存　采用组织培养技术保存植物种质,不仅可以节约人力、物力和耕地,同时亦可避免不可预测因素对种质资源造成的损失。

2. 种苗脱病毒与快速繁殖

植物病毒是引起无性繁殖作物品种退化的主要因素。病毒防治除抗病育种外,脱除种用材料所携带的病毒是目前最有效的途径。病毒在植物体内具有不均匀分布的特点,越靠近生长点,病毒含量越低,由此而发展了茎尖分生组织培养的脱毒技术。利用茎尖培养脱毒,在组织培养条件下或在具有良好的病毒传播隔离的条件下进行无病毒种苗的快速繁殖,已在许多无性繁殖植物中广泛应用,如马铃薯、甘蔗、香蕉、柑橘、苹果、草莓和一些珍稀花卉等。利用组织培养技术,亦使许多传统上繁殖系数很低的有性繁殖植物得以快速繁殖,大大提高了经济效益。

3. 细胞培养生产有用次生产物

植物几乎能生产人类所需要的一切天然有机化合物,如蛋白质、脂肪、糖类、天然药物、香料、生物碱及其它活性物质。这些化合物的生物合成均是在细胞内进行的,因此,利用细胞的大规模培养,就有可能生产这些化合物。这一领域的研究近年来引起人们极大的兴趣,通过细胞培养的植物种类已达 100多种,所能鉴别的有用成分超过 300种。这些有用次生产物主要集中在一些价格高、栽培困难、产量低、需求大的药品上,如人参糖苷、长春花蛇根碱、穿心莲素、地高辛(异羟基洋地黄毒甙)及小檗碱等。其它一些次生代谢产物如香料(小豆蔻油、春黄菊油和玫瑰油等)、食品调味剂、染料(番红花、紫草等)和树胶等也在此范畴。

利用植物生产这些有用次生产物具有广阔的应用前景。首先,它能够节约大量耕地。因为这些产物在植物中的含量常常是很低的,要获得一定的产量就必须大面积种植。而利用细胞培

养生产这些产物,就可以节约出种植相应植物所占用的耕地。另外,大多数目前所利用的可以产生次生产物的植物,其栽培常常十分困难,或是需要特殊条件,或是栽培周期相当长,如人参的栽培周期一般要 7～10年,黄连栽培周期不仅需要 5～7年,而且 1亩 (1 hm^2 =15亩)黄连还需要 1亩森林来维持 提供栽培设施)。因此,利用细胞培养生产相应的次生产物还可以保护生态环境、提高生产效率。从医药工业的角度讲,利用细胞培养生产的医药原料,其含量稳定性会更好,因此,亦有利于以中药植物为基础的民族医药事业的发展。

4. 在细胞生物学和发育生物学研究中的应用

植物不同组织、细胞培养获得再生个体,及其在此过程中所形成的调控技术本身,进一步揭示了植物细胞全能性学说的本质和内涵,是对细胞生物学领域的重要贡献。长期以来,植物细胞由于细胞壁的屏障,使植物单细胞活动的相关研究受到一定影响,原生质体体系的建立为植物细胞的单细胞研究提供了良好的实验体系。目前,利用原生质体系统在植物细胞分裂周期调控、细胞分化等细胞生物学领域的研究取得了重要成就,不仅分离出与这些细胞学现象相关的基因,而且通过原生质体系统明确了这些基因在细胞中的表达调控机理,从而明确了相关细胞生物学现象的本质。同时,通过细胞工程途径,在植物细胞的一些特殊领域如细胞壁生物学研究中也取得了重要进展。

发育生物学研究一般是在个体水平上进行的,由于个体水平上的变异频率低,因而很难对某一特定发育阶段的生物学现象进行正方向和负方向的比较研究。由于细胞工程技术的应用,利用人工细胞突变体,可以定向观察某一发育负方向所产生的生物学效应。通过这一途径,现已分离出许多与发育相关的基因,为揭示生物发育的遗传调控机理奠定了基础。离体培养的器官发生和体细胞胚发生及其调控已成为植物形态建成的良好实验体系,从而加速了发育生物学研究的发展。

5. 在植物遗传、生理生化以及植物病理等基础研究中的应用

植物细胞工程技术在植物学研究的各个领域都得到广泛应用,推动了植物遗传、生理、生化和病理学的研究,现已成为这些领域研究中的常规手段之一。

花药和花粉培养获得的单倍体和纯合二倍体植株,是研究细胞遗传的极好材料。在单倍体条件下更易获得遗传变异,便于遗传操作,较其它方法更易获得大量变异材料。同时,利用细胞途径进行染色体操作,可以有目的地创造植物附加系、代换系和易位系,为染色体工程的研究开辟了新途径。此外,花粉单倍体加倍获得纯合系的方法,还为有性繁殖植物的遗传分离群体构建提供了有效途径,从而为遗传图谱构建、基因定位等提供稳定的基础材料,其应用又促进了遗传学的发展。

细胞是进行一切生理功能的场所。因此,细胞培养和组织培养为研究植物生理活动提供了一个理想的技术体系。事实上,植物营养研究一直是植物组织培养工作的重点,已在矿物营养、有机营养和生长活性物质方面开展了大量的研究,并取得很多重要成果。用单细胞培养研究植物的光合代谢是其它方法难以取代的技术途径,近年来,光自养培养研究也取得了重要成果。在细胞的生物合成研究中,细胞培养为物质代谢途径及其调控研究奠定了基础。细胞培养研究现已在许多物质的合成代谢途径研究中取得了进展,为生物大分子物质的代谢调控奠定了基础。

植物细胞培养体系为植物病理学的深入研究提供了条件。在人工培养条件下对植物抗病性进行研究,免除了环境条件的干扰,使得结果更加真实可靠。同时,在细胞水平上对抗性的研究,

能够更好地揭示植物的抗性本质,从而也促进了植物病理学的发展。

总之,随着生物科学技术的不断发展,细胞工程的应用范围将日益扩大。细胞工程作为一个相对独立的学科和技术体系,它能直接应用于遗传改良、繁殖、物质生产等与人类社会的生存发展密切相关的各个方面,并被认为是最有可能取得突破性成就的生物技术领域。细胞工程作为一个由多学科渗透融合而形成的综合技术体系,其发展既依赖于分子生物学、细胞生物学、遗传学和生理学等相关学科理论的技术进步,同时也能作为这些学科发展的桥梁和载体,促进整个生命科学的发展与进步。

思考题

1. 细胞工程的概念、研究范畴,在生命科学中与其它学科的关系。
2. 植物细胞工程技术的发展阶段与标志性成就。
3. 植物细胞工程的作用与应用领域。

第一章

细胞全能性与形态发生

概括地说,细胞工程的核心就是在培养条件下细胞全能性表达的调控,细胞工程的所有方法可以说均是围绕这一核心产生和发展起来的。因此,可以说细胞全能性理论是细胞工程学的基本理论基础,与之相关的细胞脱分化、再分化及其调控机理则使人们更深刻地认识了细胞全能性的本质,并将其发展为现代生物技术的重要领域之一。

第一节　细胞全能性及其表达

一、细胞全能性概述

早在19世纪30年代,Schleiden(1838)以植物为材料,Schwann(1839)以动物和植物为材料,几乎同时提出了细胞学说,即细胞具有独立发展(autonomy)的能力,甚至具有全能性(totipotency)。Schwann(1839)明确指出,低等植物的任何细胞均能从植物体分离并能继续生长。因此,组成植株的细胞具有独立生命活动的潜能。

简单地讲,一个生活细胞所具有的产生完整生物个体的潜在能力称之为细胞的全能性。全能性最早的定义是指动物的卵裂球(blastomere)发育成为完整胚的能力,这一概念把全能性直接界定在受精卵细胞上。由Weismann创立的种质学更明确地认为,多细胞生物有机体由种质(germplasm)和体质(somaplasm)组成,只有种质具有全部遗传物质,是全能的,而体质在发育过程中要丢失一部分遗传物质,因此没有全能性。然而,随着人们对细胞有丝分裂机制和DNA半保留复制的深入了解,体细胞全能性已从理论上得以证实。为了获得这一理论的直接实验证据,动植物学家们展开了大量的相关实验。由于实验条件的限制,动物体细胞培养进展一直比较缓慢,因而,有关动物体细胞全能性也一直存在争议。直到1962年Grudon用非洲爪蟾小肠上皮细胞培养获得成熟蛙,才第一次证实了动物体细胞全能性。1997年,“多莉”羊的诞生进一步在哺乳动物中证明了动物体细胞的全能性。相对于动物而言,植物细胞全能性是早已被实验证明并被广泛接受的事实。早在1902年,德国著名的植物学家G. Haberlandt即预言,作为高等植物器官和组织基本单位的细胞,有可能在离体培养条件下实现分裂和分化,乃至形成胚胎和植株。这一论述就是植物细胞全能性学说(cell totipotency)的基本内容。在这一理论的指导下,经过一个世纪的发展,目前已建立了各种植物组织培养技术体系。

从理论上讲,任何一个生活细胞都有发育成完整生物个体的潜在能力,但生活细胞要表达全能性必须首先回复到分生状态或胚性细胞状态,而这种回复能力在不同类型细胞间具有相当大的差异。植物经受精以后形成的合子细胞以及早期胚胎细胞均是胚性细胞。大量实验证明,这些细胞在培养条件下容易实现细胞全能性表达。相对于动物发育的有限模式来讲,植物的发育

模式是一个无限过程。种胚萌发成苗后,在整个生活史中不断形成新的器官,直到生命终结。多年生植物的器官发生还可以年复一年地反复进行。植物连续的器官分化是由顶端分生组织细胞发育完成的,因此,植物顶端分生组织细胞具有较强地表达全能性的能力,被称为是植物胚胎干细胞 朱至清,2003)。此外,许多植物成熟器官和组织中仍保留有胚性细胞,最典型的例子是伽蓝菜 (Kalanchoe laxiflola)植物的叶片细胞,当把该植物小叶片离体培养时,沿叶片周围的细胞很快启动分裂,形成不定芽,然后发育成有根系的小植株从母体叶片上脱落下来。植物离体培养显示,大多数已分化的植物细胞也具有恢复分生状态的潜力。只有极少数完全失去分裂能力的细胞不能恢复其全能性,如细胞核已开始解体的筛管和木质部成分,细胞壁厚于 2 μm的纤维细胞,以及细胞壁达 7 μm的管胞细胞。参照动物细胞研究分类类型,植物细胞也可分为 3类:第一类是茎尖、根尖及形成层细胞。这类细胞始终保持分裂能力,从一个周期进入另一个周期,为周期细胞。第二类是筛管、导管、气孔保卫细胞等特化细胞。它们是永久失去分裂能力的细胞,为终端分化细胞。第三类是表皮细胞及各种薄壁细胞。这类细胞在通常情况下不分裂,但在受到外界刺激后可重新启动分裂,称为 G_0 细胞 (张丕方,1989; Takahashi等,1989)。按 Gautheret (1966)的观点,一个植物细胞向分生状态回复过程所能进行的程度,取决于它在自然部位上所处的位置和生理状态。从图 1.1可以看出,离生长中心越远,即分化程度越高的细胞,其向分生状态回复的可能性就越小。也就是说,高度分化的细胞表现细胞全能性的能力降低或丧失,这种能力降低或丧失的程度与分化细胞的类型和其所处的位置有关。

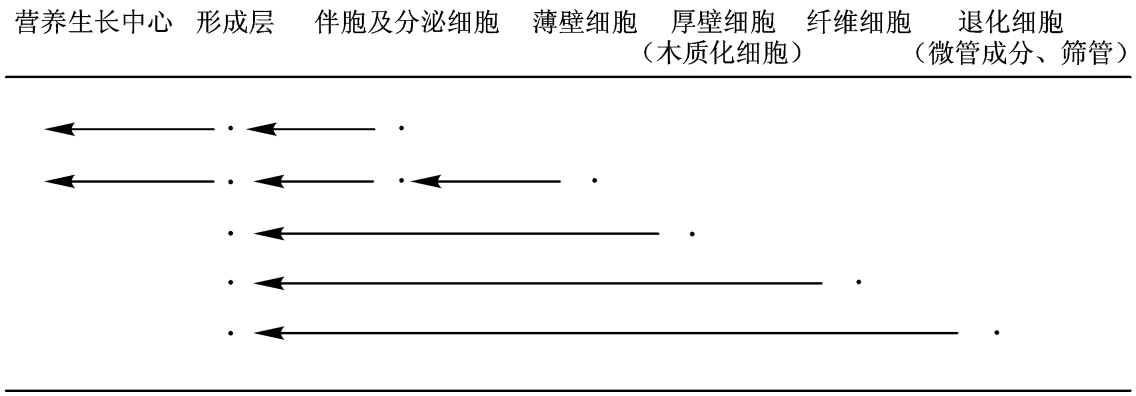


图 1.1　不同类型植物细胞向分生状态回复可能进行的程度
图中示意只有形成层细胞、伴胞及分泌细胞和薄壁细胞具有这种能力,
箭头越长代表向分生状态回复的能力越弱
(引自 Gautheret, 1966)

真核生物是一个具有高度组织结构分工的多细胞系统。处于生物体内的细胞及由其组成的不同组织均处于高度分化状态,以行使不同的生理功能。这些分化的细胞经过分裂只产生组成相应组织或器官的细胞,所以,在生物个体中,细胞的全能性不能表达。而当细胞或组织脱离母体以后,在适宜的条件下将有利于进行一些特殊的发育方式,如再生、复壮等,Child将其称之为“生理脱离”效应。显然,组织或细胞从完整的有机体上分离下来,以脱离母体的影响,这对于细胞全能性的表现是十分重要的。此外,当分化细胞脱离母体后,其细胞全能性能否成功表达还取决于人工条件的调控,这些调控过程简单地归纳起来就是细胞的脱分化和再分化。因此,从这一点出发,细胞或组织的离体培养技术就是细胞脱分化和再分化的控制过程。从理论上讲,只要自如地调控细胞脱分化,就可以使细胞进入分裂生长,只要掌握了细胞再分化的技术,就可以使细

胞重现其全能性。已有的研究资料显示,细胞或组织与母体的分离和激素的调控是细胞全能性表达的基本前提。

二、培养条件下的细胞脱分化

离体培养条件下,细胞全能性的表达是通过细胞脱分化和再分化实现的。在大多数情况下,脱分化是细胞全能性表达的前提,再分化是细胞全能性表达的最终体现。

通常认为,培养条件下使一个已分化的细胞回复到原始无分化状态或分生细胞状态的过程就是细胞脱分化(dedifferentiation)。但对于细胞脱分化是在启动分裂的过程中完成,还是发生在细胞分裂之前,学术界一直存在不同的观点。一种观点认为,在离体培养条件下,一个分化细胞转变为分生状态,进入细胞分裂的现象即为脱分化。另一些学者认为,细胞脱分化发生在细胞分裂之前,细胞分裂只是细胞脱分化的结果,而不是脱分化的过程。张丕方(1989)在烟草表皮细胞培养的活体连续观察后指出,脱分化过程发生在第一次有丝分裂之前,认为在植物细胞中,执行一定功能的 G_0 期细胞接受外界信号后,由于基因的选择性表达,使细胞发生一系列生理和生化变化,进而脱离 G_0 期重新进入细胞分裂周期,即完成细胞脱分化。随着细胞分子生物学研究的不断深入,这一观点已被众多研究者认可(Zhao等,2001;Boucheron等,2002)。显然,无论细胞启动第一次分裂是脱分化的过程还是脱分化的结果,静止细胞启动分裂都是分化细胞成功脱分化的重要标志。正因为如此,研究启动静止细胞脱分化到细胞第一次分裂所涉及到的一系列基因调控和生理生化过程,一直是近年来细胞生物学研究中的重要领域之一。

1. 细胞脱分化过程中的生理活动与细胞结构变化

植物体内除了少数生长点分生细胞外,大多数细胞为分化细胞。在这些分化细胞中又以成熟的薄壁细胞为主,它们在形态上与分生细胞具有明显的区别,如细胞核较小,核位于细胞边缘,细胞中央有大的液泡,细胞体内核糖体密度较低,多聚核糖体数目较少,质体为分化程度较高的叶绿体、杂色体、白色体和淀粉体。这些分化细胞在培养条件下,脱分化过程中细胞结构会发生急剧变化。这些变化总体上包括:细胞质显著变浓,大液泡消失,核体积增加并逐渐移位至细胞中央,细胞器增加。在这些变化中,液泡蛋白体的出现和质体转变为原质体被认为是细胞脱分化的重要特征。朱至清等(1984)在研究烟草叶肉细胞脱分化的过程中观察到,培养 20 h开始至 3~4 d,脱分化细胞的液泡出现电子密度很高的圆球体,同时还可观察到液泡中有一些新形成的球形细胞质团,其大小和外形与蛋白体十分相似,并经常和蛋白体相连结。因此认为,这些新的细胞质团可能是在蛋白体的基础上形成的,其结果是实现细胞脱分化过程中的细胞质改组。Cionini等在 1987年也报道了类似的研究结果。在大多数情况下,蛋白体的出现和细胞质密度增加是同步的,这一现象被认为是细胞开始脱分化的标志。

质体是植物细胞的重要细胞器,它在细胞内主要有 4种形式:即原质体、叶绿体、白色体和有色体。质体不同形式之间可以相互转化,在活跃分裂的分生细胞中主要以原质体形式存在。烟草叶肉细胞培养显示,伴随着细胞脱分化的进程,叶绿体内淀粉粒增大、增多,与此同时,叶绿体以缢裂方式分裂,分裂后形成的质体体积变小,片层退化并逐渐消失,随后转化成淀粉体,淀粉体中的淀粉消耗后,转变为原质体。电镜观察显示,叶肉细胞脱分化过程中,叶绿体的基粒片层解体,并出芽形成原质体,产生的原质体芽内有 DNA成分。

细胞脱分化过程中线粒体在数量、嵴发达程度以及在细胞内的分布等均发生变化。一般而

言，同一类型的已分化细胞的线粒体数量和结构均较稳定。在脱分化过程中，线粒体数量随脱分化的启动而迅速增加，嵴由不发达逐渐趋于发达，其形态包括棒状、哑铃状、颗粒状和环状。黎众魁和汪德耀（1995）在芦柑子叶细胞脱分化的过程中还观察到，线粒体分布出现规律性变化，脱分化初期线粒体常与微体一道聚集在细胞内，与之相伴出现高密度的细胞质，随后线粒体与发达的粗面内质网聚集分布，在细胞完成脱分化时，线粒体的分布趋于均匀。由此可以推断，细胞脱分化过程涉及到活跃的能量代谢过程。此外，细胞脱分化时微体、高尔基体和粗面内质网等细胞器也显著增加（李喜文等，1994；许萍和张丕方，1996）。

由于培养初期外植体取材部位的差异，不同类型分化细胞或行使不同功能的细胞在细胞结构上亦存在较大差异，因此脱分化初期细胞的变化也会不同。在培养的芦柑子叶细胞脱分化过程中观察到，培养初期最先发生变化的是脂质贮藏物质的逐渐减少和消失（黎众魁和汪德耀，1995），而后才发生上述细胞脱分化的变化。崔克明和王雅清（2000）利用一个杜仲剥皮再生的活体系统，也观察到细胞脱分化过程具有相似的结果，只是质体向原质体转化时没有产生淀粉，这一现象同样也在萱草花粉细胞脱分化时观察到（吴燕和周嫦，1992）。

根据细胞脱分化过程中细胞结构发生变化的时空顺序，细胞脱分化过程可分为3个阶段：第一阶段为启动阶段，表现为细胞质增生，并开始向细胞中央伸出细胞质丝，液泡蛋白体出现；第二阶段为演变阶段，此时细胞核开始向中央移动，质体演变成原质体；第三阶段为脱分化终结期，回复到分生细胞状态，细胞分裂即将开始。

2. 细胞脱分化的调控机理

越来越多的离体培养显示，一个培养体系成功建立的关键在于如何启动细胞从分化状态回复到分生状态，上述细胞结构的变化只是反应了脱分化过程中可能发生的可视事件，或者说是细胞脱分化的一些标志性转变，这些转变必然是在一系列调控机制的作用下产生的。细胞离体培养研究表明，细胞脱分化调控的实质是 G_0 期细胞回复到分裂周期的调控过程，研究这一过程中细胞内发生的各个事件的顺序和调控方式，是深入理解细胞脱分化机理的根本所在，也是近年来生命科学研究的重要领域之一。

在细胞正常生长情况下，细胞周期是一个连续的不可逆过程，一旦DNA发生复制，随后即进入有丝分裂状态形成2个子细胞。因此，细胞通常在 G_1 期通过某些机制来决定是否进入S期。20世纪70年代，研究者发现在哺乳动物 G_1 期细胞中存在有特定的调控点，称为“限制点”（R point）。在这个点之前，如果缺少外界生长信号（通常是肽生长因子）或某些必需的营养成分（如必需氨基酸），细胞会终止其 G_1 期的进程，进入静止状态称为 G_0 期，一旦补充了所缺少的因子之后，细胞即会从 G_0 期回到 G_1 期继续分裂周期。2001年度的诺贝尔生理学及医学奖获得者、美国科学家Hartwell与英国科学家Hunt和Nurse的工作揭开了这一过程的调控机制。他们发现，真核生物细胞中存在有复杂的调节细胞周期的关键分子，它们通过相互制约或偶联形成复杂而精确的细胞周期调控网络。在这些关键分子中，cyclin（细胞周期蛋白）和CDK（cyclin－dependent kinase，周期蛋白依赖激酶）是两类主要的调控分子。细胞周期运行的动力主要来自CDK，其活性则主要通过cyclin调节。目前已发现细胞内存在有不同类型的cyclin和CDK，CDK在相应的细胞周期时相中与其对应的周期蛋白相结合而被活化。同时，为了保证细胞在分裂时各环节的正确性，CDK的活性还受另外一类蛋白质的负向调节，这类蛋白质被称为CKI（cyclin－dependent kinase inhibitor，周期蛋白依赖激酶抑制子）。因此，科学家形象地把CDK比作引擎，而

cyclin则是油门，CKI是刹车（吴家睿，2002）。这一发现不仅有助于解释正常静止细胞为何会转向无序分裂的癌细胞，也为理解分化细胞脱分化进而启动分裂和再生器官或个体奠定了基础。

植物细胞具有细胞壁，通过胞间联丝将细胞相连，从而组成各种器官和组织。同时，在同一器官和组织内，又时常存在不同状态的细胞。因此，植物细胞周期的调控，除了细胞本身外，还受到周围细胞状态的影响。此外，由于细胞壁的屏障和胞间联丝的作用，使植物的单细胞操作十分困难，从而使植物细胞脱分化调控的研究更加复杂化。早期利用衣藻细胞的研究显示，雄配子型细胞在其生活周期发生叶绿体 DNA甲基化和去甲基化的周期性变化。配子型细胞发生时，叶绿体 DNA被甲基化，而处于完全分化的配子型细胞又可以通过氮源调节，使其脱分化回复为营养型细胞，在这一过程中叶绿体 DNA发生去甲基化。脱分化的叶绿体去甲基化主要通过甲基化酶的活性降低来实现（Sano等，1982）。Natali等（1986）将蚕豆根尖分生组织细胞与分化组织细胞的 DNA进行 CsCl梯度离心的比较发现，在脱分化细胞中存在有一条重链带，而分化细胞中则没有此带。根据胸腺嘧啶^{3}H标记的实验结果推测，细胞脱分化时在 DNA的富含 G＋C的区域发生了选择性扩增。随着荧光标记技术灵敏性的不断提高和原生质体操作技术的不断稳定，利用叶肉原生质体系统对植物细胞脱分化的研究已取得重要进展。同时，一个高度同步化分裂的烟草细胞系 BY－2的建立（Nagata等，1992）及其细胞同步化技术的应用，也为植物细胞脱分化及其相关研究提供了模式体系。近年来，利用这些系统对植物细胞有丝分裂的调控研究已取得许多重要进展，并已分离和检测出多个与植物细胞脱分化相关的基因，为了解植物细胞在培养条件下脱分化，进而进入有丝分裂周期的调控过程奠定了基础。

现有的研究资料显示，植物细胞周期的调控主要有两类 CDK（CDK－a，CDK－b）和两类细胞周期蛋白（CycB、CycD）。在环境或激素等外界条件作用下，CycD基因首先表达生成 CycD，在相关调节因子的帮助下，CycD与 CDK－a结合形成 CDK－a－CycD复合体使 CDK－a活化，进而对 Rb（G_1期限制点调控分子）磷酸化，使细胞通过“限制点”进入分裂周期。当细胞进入分裂周期后，则由 CDK－b与 CycB以及相关的调节蛋白完成从 S期到 M期的调控（图 1.2）。然而，在离体培养条件下由于所取外植体细胞在植物体内所处的组织器官不同，其分化状态也存在很大差异，不同分化程度的细胞是否存在相同的细胞分裂周期激活机制，在不同的培养诱导中是何种机制首先感受培养条件的刺激进而启动细胞进入分裂状态等，目前还没有足够的研究。

植物激素是离体培养中所必需的条件，因此，与植物激素相关的基因表达被认为是启动细胞脱分化的关键。Takahashi等（1989）从 1个叶肉原生质体 cDNA文库中分离到 1个 2,4－D诱导表达的基因，当原生质体在附加 2,4－D的培养基中培养 30 min，即可检测到这个命名为 par的基因的转录表达，而叶片和新分离的原生质体，以及原生质体培养在没有 2,4－D的培养基中时，则检测不到该基因的表达，在旺盛生长的烟草细胞悬浮系中其表达信号也很低。进一步研究证明，par基因的表达发生在叶绿体细胞进入 DNA合成之前，因此认为该基因在细胞从 G_0期转入 S期的早期启动中具有功能性作用。Kyo等通过硫蛋白基因 N端氨基酸序列高度保守的特点设计简并引物，克隆了一组花粉富含硫蛋白（pollen－abundant phosphoproteins）的基因 NtEPa，NtEPb，NtEPc，其中 NtEPc的表达与花粉细胞脱分化转变为胚性细胞高度偶联，且该基因的表达需要培养基内存在一定浓度的细胞分裂素，当 BA（6－苄基腺嘌呤）浓度过低时其表达活性也随之降低。在旺盛分裂的细胞系 BY－2中没有检测到该基因的表达，小孢子以及花粉发育过程中也没有检测到该基因的表达。因此认为，该基因参与花粉细胞培养中细胞脱分化的过程，但不参

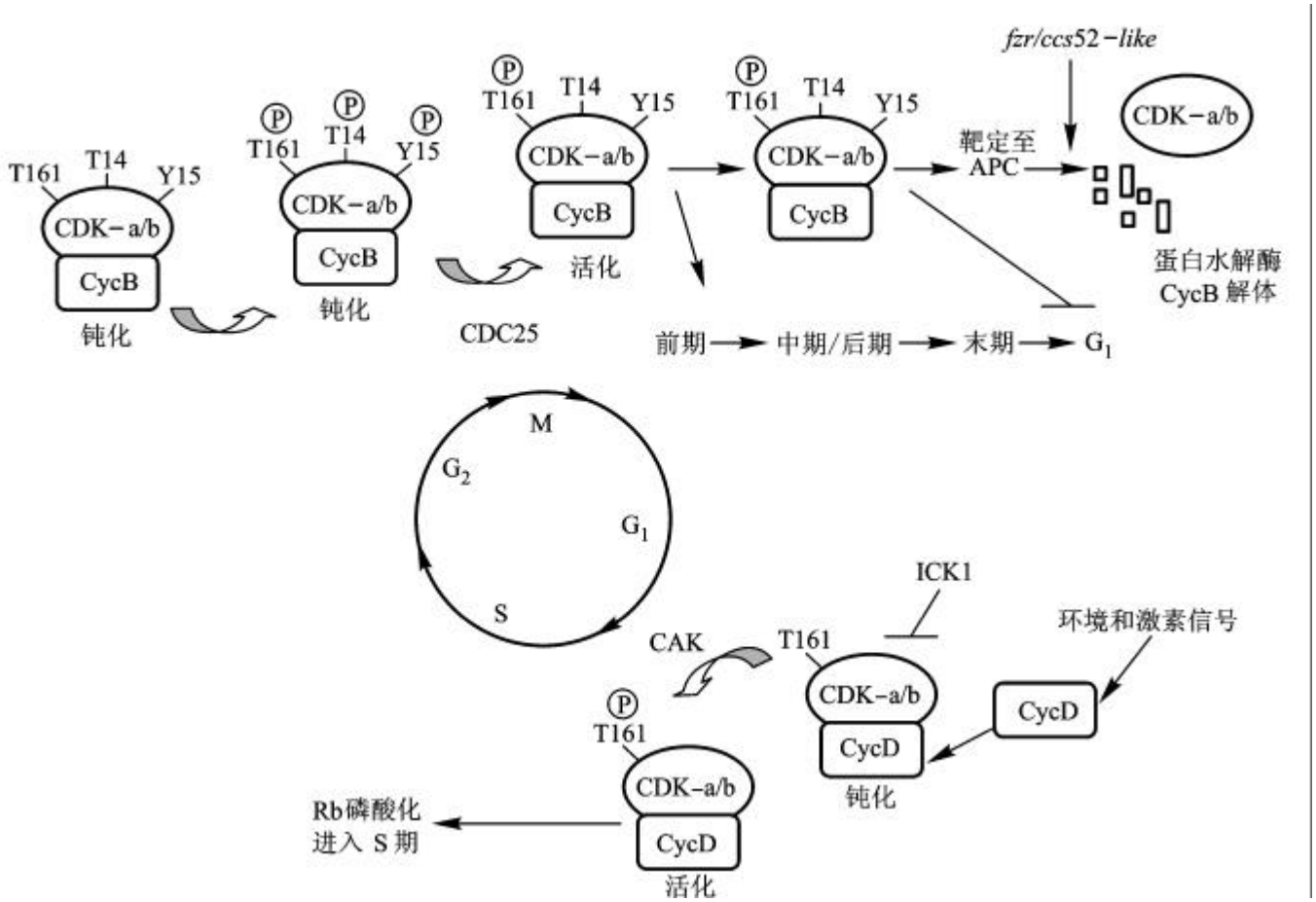


图 1.2　细胞有丝分裂调控过程

CDK的活性高峰出现在细胞分裂的 G_1 到 S和 G_2 到 M期，来自内外部的信号导致与 CDK－a相联系的 D型细胞周期蛋白（CycD）水平提高。T161复合体通过 CDK活化激酶 CAK而激活，但 CDK抑制子 ICK1可抑制该复合体的激酶活性。在 G_1 后期，CycD－CDK－a激酶活性水平的提高导致成视网膜细胞瘤（Rb）磷酸化，使 Rb钝化，E2F转录因子被活化，S期基因表达。进入 M期的细胞含有钝化的 CDK－CycB复合体，需要 CDC25活化 CAK以及去除 T14和 Y15上的磷酸化，活化的复合体有助于细胞进入分裂前期。细胞周期的进一步调节出现在末期和 G_1 期之间，需要由有利细胞分裂后期的复合体（APC）使有丝分裂 CDK活性丧失。特异组分的靶位点可能包括 1个与果蝇属 FZR有关的基因 ccs52。该模型描述的是基于哺乳动物的细胞周期，但除了 CDC25磷酸酶外，大部分因子亦存在于植物中

（引自 de Boer and Murray, 2000）

与细胞进入分裂周期后的调控过程。

目前已从不同植物中克隆出多个植物激素诱导表达的基因，但大部分基因的功能并不清楚。现有研究证明，植物激素本身并不能直接作用于 DNA从而导致特定基因的激活，而是需要其受体蛋白以及其它信号转导过程的参与。生长素受体（auxin receptor）研究表明，植物细胞感受生长素的信号是通过生长素受体和生长素分子相结合，使生长素受体被活化来完成的，这一过程称为生长素感应（perception）。激活的受体可能引起某些特定的反应，如某些离子的吸收或释放、特定蛋白的磷酸化或去磷酸化等，进而引起一系列连锁信号的传导反应，最终导致生长素诱导的基因表达（许智宏和刘春明，1998）。Matsubayashi和 Sakagami（1996）应用一个竞争性酶联免疫分析系统，在石刁柏（Asparagus officinalis）叶肉细胞低密度悬浮培养系统中，首次分离到二个促分裂肽——phytosulfokine－α和 β（PSKα，PSKβ），它们分别是磺酸基 5肽［Tyr（SO_3H）－Ile－Tyr（SO_3H）－Tyr－Glu］和 4肽［Tyr（SO_3H）－Ile－Tyr（SO_3H）－Tyr］。细胞检测分析发现，同时有 NAA（α－奈乙酸）和 BA存在的条件下，第一次细胞分裂发生在培养 96 h，而培养 48 h即可检测到 PSKα。在培养基没有 NAA和 BA的培养细胞中，检测不到 PSKα的存在，同时细胞也停留

在 G_0/G_1 期而不能启动分裂。由此推测,在细胞脱分化和促进细胞分裂的过程中,PSKα可能介导了与生长素和细胞分裂素密切相关的信号转导途径 (Matsubayashi等,1999)。目前已在水稻、拟南芥、玉米、百日草以及胡萝卜等多种植物中均已检测到 PSKα,且不同植物 PSKα氨基酸序列高度保守,说明 PSKα可能广泛存在于各种植物中。从水稻中克隆出编码 PSK前体的基因,该基因编码 89个氨基酸残基组成的 PSK前体 (PP-PSK),经水解加工后 PP-PSK即转变为 PSKα (Yang等,1999)。近期又从拟南芥中分离到 4个编码 PSK前体的基因,序列分析显示,它们与水稻编码 PSK前体的基因具有同源性,推测在植物中可能由此形成相同的信号分子 (Yang等,2001)。进一步研究表明,水稻细胞质膜存在有 PSKα的蛋白质受体,已分离的蛋白质受体为相对分子质量 120×10^3 和 160×10^3 的膜蛋白。从烟草细胞纯化的相对分子质量为 120×10^3 的蛋白为一受体激酶,含有一个胞外富含亮氨酸重复结构域和一个信号转导结构域,与 PSK高度亲合,显示 PSK和相对分子质量为 120×10^3 的受体激酶是一活跃的配体-受体对 (Matsubayashi和 Sakagami,2000)。过量表达受体蛋白基因,能显著提高愈伤组织的生长率,而抑制受体蛋白基因表达则同时抑制了愈伤组织的生长。综合分析已有研究结果认为,PSK与 PSK受体结合是一个涉及到植物细胞脱分化以及保持细胞脱分化状态的级联信号调节机制 (Matsubayashi等,2002)。

早期研究证明,在细胞脱分化初期,细胞内首先出现新 mRNA的增加,即相关基因表达出现在 DNA复制之前,但这期间核染色体是否发生变化却一直没有资料报道。直到 2001年,Zhao等以烟草叶肉细胞原生质体为材料,采用流式细胞仪和微球核分析技术,首次成功观察了烟草叶肉细胞脱分化过程中染色体的二次解凝聚过程。第一次解凝聚发生在细胞壁酶解过程中,第二次解凝聚发生在原生质体在含有生长素和细胞分裂素的培养基中诱导培养 36 h。实验显示,第二次解凝聚对于细胞进入 S期是十分重要的,发生 2次解凝聚的细胞在培养 72 h后即进入 S期,而在不含植物激素的培养基中的细胞,染色体不发生第二次解凝聚,细胞此后迅速死亡。研究者认为,第一次染色体解凝聚是细胞脱分化的转换过程,通过此过程细胞关闭分化状态,而第二次解凝聚则是有丝分裂周期的衔接过程。显然,细胞脱分化过程涉及到众多相关基因的表达,染色体的解凝聚则有利于这些基因转录。然而,细胞脱分化是一个复杂的过程,在这个过程中,不同层次级联的调控顺序及其协同作用还远没有清楚。相信随着植物细胞生物学研究的不断深入,将使细胞脱分化的调控机制更加明晰。

3. 细胞分裂与愈伤组织形成

尽管目前大多认为细胞脱分化是细胞状态的改变,但成功的脱分化必然会导致细胞分裂。在一个细胞群体培养或组织器官培养体系中,有时很难区分细胞脱分化与进入增殖状态的界限。

对于单个细胞而言,分化细胞启动分裂显然是发生在细胞完全脱分化之后,其第一次分裂方式常常比较复杂。大多数研究表明,进入分裂周期的细胞第一次分裂即为正常的有丝分裂。但在一些研究中也观察到,培养细胞的初期的前几次分裂为无丝分裂,以后才转入正常的有丝分裂 (陆文梁,1983;王琦和张丕方,1989)。朱至清 (2003)认为,细胞初期的分裂方式与外植体细胞类型有关。如果外植体细胞均为正常二倍体细胞,第一次分裂通常是有丝分裂,如果外植体含有高倍化细胞,脱分化的第一次分裂可能是无丝分裂。他在烟草叶肉细胞培养中观察了培养初期 16~24 h的 2 000多个细胞的分裂情况,无一例外地全部为正常有丝分裂。

对于组织器官培养而言,细胞分裂往往首先发生在组织分离时的伤口部位。烟草叶片外植

体培养显示,在培养 32 h左右,靠近伤口的部分栅栏细胞和海绵细胞已完成第一次分裂,培养 3 d即可见伤口处形成小的新生细胞团,以后细胞分裂逐渐延伸到整个外植体,进而形成愈伤组织。由此表明,在一个组织和细胞群体培养体系中,细胞脱分化和进入分裂的过程并非是同步的。在组织培养中通常可观察到,一旦伤口处某些细胞启动分裂,之后可很快影响整个外植体细胞进入分裂周期而启动分裂。由此也说明,当细胞处于群体和组织结构状态下,细胞之间存在有敏感的相互联络机制,使细胞的状态和行为相互影响,这也就是为什么单个细胞培养往往要比群体细胞培养困难得多的原因之一。

尽管在大多数情况下,细胞脱分化后进入细胞分裂的结果是形成愈伤组织,但绝不是说所有的细胞脱分化的结果都必然形成愈伤组织。许多实验表明,有些外植体的细胞脱分化以后直接形成胚性细胞,进而形成体细胞胚。同时,还应注意的是,多数愈伤组织内的细胞并不都是未分化的,即同一愈伤组织内的细胞之间其状态存在一定差异。特别是在组织器官培养时,往往出现部分细胞不完全脱分化的现象,从而使其很容易再分化成再生植株,这对培养来说无疑是十分有利的。同时也说明,脱分化与愈伤组织的形成在性质上是不能等同的。脱分化是细胞生理状态的改变,而形成愈伤组织是离体培养中的一个阶段。

三、细胞分化

细胞分化 (differentiation),是指导致细胞形成不同结构,引起功能改变或潜在发育方式改变的过程 (许智宏,1998)。一个细胞在不同的发育阶段上可以有不同的形态和机能,这是在时间上的分化;同一种细胞后代,由于所处的环境 (如部位)不同而可以有相异的形态和机能,这是在空间上的分化。单细胞生物仅有时间上的分化,如噬菌体的溶菌型和溶原型。多细胞生物的细胞不但有时间上的分化,而且由于在同一个体上的各个细胞所处的位置不同,因而发生机能上的分工,于是又有空间上的分化,如一个植物个体在其顶端、根、茎和叶等不同部位具有不同的细胞。细胞分化是多细胞生物个体形态发生的基础,为其生活所必需,如果细胞分化有缺陷或失去控制,它们的个体乃至种族就无法生存。从分化的遗传控制角度讲,细胞分化是各个处于不同时空条件下的细胞基因表达与修饰差异的反应,所以,分化也是相同基因型的细胞由于基因选择性表达所反应的各种不同的表现型。近年来,有关高等生物胚胎发育的分子调控已取得诸多研究进展,为离体培养条件下脱分化细胞的再分化研究提供了重要参考。

在活体内,基因表达由生物体的遗传性规定了严格的程序和模式,通过调节机制,决定某一细胞在何时、何地、何种情况下表达哪一类基因。在离体条件下,当细胞脱分化以后,无序生长的细胞及其愈伤组织要重新进入有序生长才能再生为个体,因此,通常把离体培养下的这一过程称为再分化 (redifferentiation)。再分化的过程事实上是基因选择性表达与修饰的人工调控过程。这一过程调控的难易程度,通常取决于我们对控制分化的相关基因的了解程度。因此,研究离体培养条件下再分化的分子细胞生物学机理,也是细胞工程的重要基础领域。

1. 细胞分化与基因组变化

在动物的细胞分化过程中,可以观察到的最常见的变化是细胞不分裂而是染色体的反复复制,这一现象分为两种类型:一是核内有丝分裂,二是多线染色体 (Müller,1998)。在植物的一些极端分化细胞类型中也存在这一现象,如核型胚乳细胞早期分裂即是典型的核内有丝分裂。在菜豆属植物几个种的胚柄细胞中已观察到多线染色体的现象,在胚柄细胞中,从近胚一端到珠孔

端,DNA的复制呈梯度递增,在接近珠孔端的巨型胚柄细胞中,DNA的含量可达 4 096 C,在个别情况下甚至达到 8 192 C。此外,植物细胞的分化在整个植物中除了与发育阶段有关外,也与环境条件的变化有关,一个典型例子就是在不同生长条件下植物组织的肉质化程度与核内染色体分裂相关,如长寿花 (Kalanchoe blossfeldiana) 在短日照条件下生长时叶片肉质化程度增加,与此同时,染色体的核内复制也增加,此时叶片的细胞核为 16x和 32x。而在长日照条件下的叶片,细胞核为 4x和 8x,长日照下的叶片肉质化的程度也随之降低 (许智宏,1998)。

DNA的差异扩增 (differential amplification) 在一些生物的发育和分化中起着重要作用。在这方面研究较多的是两栖动物卵母细胞中 rDNA的过度扩增。在植物洋葱根尖中也观察到,正处于分化阶段的后生木质部细胞编码核糖体 RNA的基因大量增加,其拷贝数可达 1 125～3 000左右。新近的一些研究表明,在植物不同组织中,卫星 DNA的含量存在差异,由此推测,这种差异可能与细胞分化有关。在离体培养兰属 (Cymbidum) 原球茎的正在分化的薄壁细胞中,检测分离到大量扩增的卫星 DNA,而在非分化细胞中则不存在这一现象。

在细胞的分化发育中,另一类基因组的变化是基因重排。例如,在玉米、金鱼草等植物中,转座子的移动能引起很多发育性状的改变,一些植物线粒体基因组的改变还能引起雄性不育等。但由于这种基因重排发生在异型细胞形成后期,所以这种重排是引起分化的原因还是分化的结果,目前还存在争议。

尽管某些细胞分化中确实存在染色体反复复制和 DNA差异性扩增等现象,然而,随着动物细胞分化的分子机制研究的不断深入,已经证明这些变化并不是细胞分化的实质,而从基因表达到产物形成及其在这一过程中的调控与修饰,才是细胞分化的本质所在。越来越多的研究显示,细胞分化主要受基因在转录水平和转录后水平的调控,其中一些特异蛋白基因的表达调节,在细胞分化过程中起到了重要作用 (汪堃仁等,1998)。按照基因表达与生长发育的关系,基因可分为两类:一类是维持细胞最低生命活动的基因,它们是细胞基本活动不可缺少的,如组蛋白基因,因此称之为管家基因 (house keeping gene)。另一类是与细胞行使特殊功能有关的基因,这类基因功能的丧失与细胞生存不会有直接影响,但在特定组织、器官内或特定发育时期内会导致细胞不能行使正常功能。由于这类基因常常在一定条件下大量表达,因而称为奢侈基因 (luxury gene)。细胞分化从基因调控水平上来说即是这类奢侈基因选择性表达的结果,不同类型的奢侈基因的表达,会导致细胞分化产生不同功能的细胞。分析不同功能细胞分化过程中的基因表达与调控,无疑是从本质上了解细胞分化机理的有效途径。目前,这一领域已在动物和植物胚胎发育研究中进行了大量研究。然而,由于培养体系的限制,植物离体培养条件下,细胞早期分化的基因调控研究还十分有限。

2. 极性与细胞分化

极性 (polarity) 是植物细胞分化中的一个基本现象。Bünning曾指出,没有极性就没有分化。所谓极性是指植物的器官、组织,甚至单个细胞在不同的轴向上存在的某种形态结构以及生理生化上的梯度差异。极性无论在低等植物或高等植物中均普遍存在。如低等植物的藻类,合子一端的细胞发育成假根,另一端的细胞则发育成叶状体或丝状体。在高等植物中,极性更为明显,它通常在合子分裂早期就已确立。如合子第一次不均等分裂所形成的基细胞和顶端细胞就分别进入了不同的发育途径,基细胞发育成胚柄,顶端细胞分裂成胚胎本身。胚胎细胞的极性在发育中更为明显,一端形成胚根,另一端形成胚芽。极性一旦建立,在一般情况下不可逆转,这在一些

植物茎或根切段培养的经典实验中已明确地得到证实。

在很多情况下,细胞的不均等分裂是细胞极性建立的标志。植物个体发育是一个连续的过程,细胞分化可以说伴随在整个生命周期中。细胞分化过程中出现的不均等分裂发生在合子的第一次分裂,而且在不同类型细胞中均可观察到,如气孔细胞、根毛细胞及花粉生殖细胞等。近年来的研究显示,某些细胞如果不进行不均等分裂,就不能成功分化功能细胞。Eady等(1995)在一个转基因番茄花粉体外培养系统中观察到,花粉细胞发育过程中,只有第一次有丝分裂为不对称分裂才能萌发花粉管。当花粉第一次有丝分裂为均等分裂时,只形成2个营养细胞而不能形成精细胞。根毛细胞分化中也观察到不对称分裂的现象,在根表皮细胞分裂形成根毛时,第一次有丝分裂必须是不对称分裂,以后才能发育成根毛。Bouget等(1998)应用海水培养系统,在显微镜下成功观察了一种褐色海藻 Fucus合子经不对称分裂而建立极性的发育过程(图1.3a—e)。Fucus是一种大型海藻,在它的生殖时期释放大量精子和卵子到海水中,卵细胞受精初期形成的合子并没有极性(图1.3a),在用单侧光处理时可观察到细胞极性建立,18 h后发生极化,进行第一次不均等分裂(图1.3b,c)。较小的基部细胞将发育成固着结构体(假根 rhizoid),以便使其能固着在岩石上;较大的一端将来则发育成行使光合作用的叶状体(thallus)(图1.3d,e)。

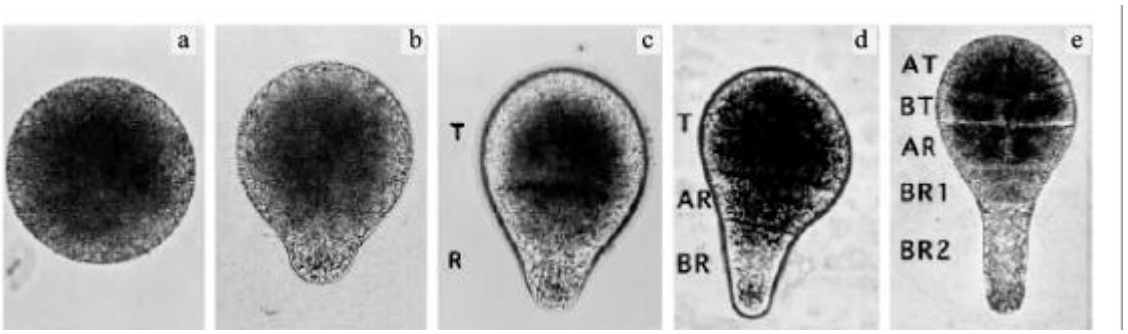


图1.3　Fucus合子细胞不均等分裂及其早期发育
(引自 Bouget等,1998)

研究表明,极性建立与质膜离子通道的不对称分布和细胞周质微管重排有关。在单侧光条件下,Fucus受精卵质膜的向光的一端(顶端)分布着许多 Ca^{2+} 泵,而在背光的一端质膜上则分布有许多 Ca^{2+} 通道,形成受精卵细胞从基部到顶端的 Ca^{2+} 梯度,其结果是细胞核向下移动,分泌小泡在基部积累,随后在基部细胞壁沉积一种特异的硫酸化多糖。这种细胞内不同方向 Ca^{2+} 梯度分布被认为是许多高等植物细胞极性生长的重要原因(Cove,2000)。

这种离子通道的不对称分布又与环境和重力有关。Goodner和 Quatrano(1993)通过在不同光照梯度(单侧光或双侧光)条件下对墨角藻极性建立进行的研究,将其极性轴向建立分为3个基本过程:a.由单侧光处理合子细胞时,受精后4～10 h即形成极性,但此时建立的极性轴向仍不稳定,通过不同方向的光照处理可使其重新定向。b.极性轴向的稳定或固定,一般在受精后10～14 h。在此期间,即使改变光照处理的方向也不能改变假根的位置。c.形成的极性在细胞结构上表现出来,一般在受精后14～18 h。细胞超微结构研究显示,细胞骨架如微管、微丝的重排在细胞早期极性建立的过程中起到了重要作用。使用单侧光照射 Fucus受精卵细胞诱导极性时,在预期形成假根的部位,以及细胞分裂后的二细胞期,或在稍后的胚胎假根的顶端,均有 F肌动蛋白(纤维状肌动蛋白)的积累。而在侧光处理之前,F肌动蛋白在合子中的分布是均匀的。在这一时期,如果用 CB处理或用酶除去细胞壁,也可使极性轴向发生改变。所以微丝和细胞壁

对于已形成的极性轴向的稳定维持是非常重要的。

3. TE细胞分化及其调控

高等植物的维管系统具有水分和营养物质运输、传递生物与环境信息以及机械支撑以保持植物体的正常形态等多种功能。作为维管系统的主要成分,管状分子 (tracheary elements, TEs) 在维管系统的形成中具有中心作用。在植物系统发育条件下,TEs由根和芽的原形成层或次生形成层细胞分化形成。在离体培养条件下,TEs则由愈伤组织薄壁细胞分化形成,这也是愈伤组织细胞分化器官的前提。如果愈伤组织一直保持薄壁细胞状态,TEs分化受阻,器官发生则不正常。不难理解,只有愈伤组织的某些细胞分化形成 TEs,进而才可能形成维管系统,器官才能进一步分化形成。而极性的建立似乎又是维管发生的一个信号。极性建立后生长素按极性方向流动,导致 TE细胞分化 (Sachs, 2000)。因此,人们通常把离体培养中 TE细胞的出现作为组织分化的标志。同时,由于 TE细胞在分化过程中具有细胞壁加厚,原生质体自溶等容易观察的细胞特征,又为植物细胞分化研究提供了模式体系。特别是由 Fukuda等 (1994) 建立的百日草 (Zinnia) 叶肉细胞 TE分化体系,在培养条件下,叶肉细胞不经过分裂而直接形成 TE细胞,更为细胞分化研究提供了便利的工具。他们把叶肉细胞不经过分裂而直接通过分化转变成为 TE细胞的过程称为转分化 (transdifferentiation)。

研究显示,TE细胞的分化涉及到一系列基因调控下的、复杂的细胞学过程,包括不同类型基因表达、激素的极性流动、细胞骨架的重排、细胞壁和细胞器变化等。Fukuda (1997) 根据分离的百日草叶肉原生质体转变为 TE细胞过程中的细胞学事件、生化事件及其分子标记,将 TE细胞分化划分为 3个阶段 (图 1.4)。

第一阶段是叶肉细胞脱分化的过程。其典型的细胞学特征是,微丝发生重排形成网状结构,将叶绿体锚定在质膜上,进而叶绿体降解,同时细胞明显拉长。在此期间表达的基因可划分成 3组:一组是受伤诱导基因,如编码蛋白酶抑制子的 ZePI-1和 ZePI-2;第二组是一些与蛋白质合成组装相关的基因,如核糖体蛋白基因 S3a、S3和 PO (ZeRPS3a、ZeRPS3、ZeRPPO);第三组是延伸因子如 ZeEF1b。这一阶段的基因表达,通常均与受伤诱导有关,但在此阶段的后期,基因的转录水平通常与培养基中是否有植物激素有关。

第二阶段为脱分化叶肉细胞向 TE细胞的转分化阶段。在此期间,涉及到许多基因的特异表达。首先是一些与 TE细胞分化有关的基因如 TED2、TED3、TED4的特异表达。Demura和 Fukuda (1993, 1994) 的研究显示,这类基因只在 TE前体细胞、未成熟木质部细胞以及导管细胞中表达,在植物体内也只在 TE细胞初期分化的原形成层细胞中表达。与此同时,在第一阶段表达的与蛋白质合成有关的基因进一步大量表达,使这一时期的细胞内积累大量的新 RNA和蛋白质,说明在细胞转分化期间,细胞内发生了活跃的代谢调控过程。此外,与细胞骨架相关的微管蛋白基因 ZeTubB1和 ZeTubB3也大量表达 (Yoshimura等, 1996),同时还表达那些与细胞壁结构成分相关的基因,如木质素合成的相关基因等,这类基因的表达有利于 TE细胞的次生壁加厚。另有研究显示,Ca/CaM (钙-钙调蛋白) 系统参与了这一阶段的基因表达 (Kobaya和 Fukuda, 1994),油菜素内酯也参与了这一期间与次生细胞壁成分合成相关的基因的表达调控 (Yamamoto等, 2001)。

第三阶段进入 TE细胞特化阶段。在此期间,细胞壁加厚,原生质自溶,细胞核和细胞器消失,细胞骨架呈网状螺旋排列,整个细胞变成管状细胞 (图 1.5)。在整个植物体内或愈伤组织

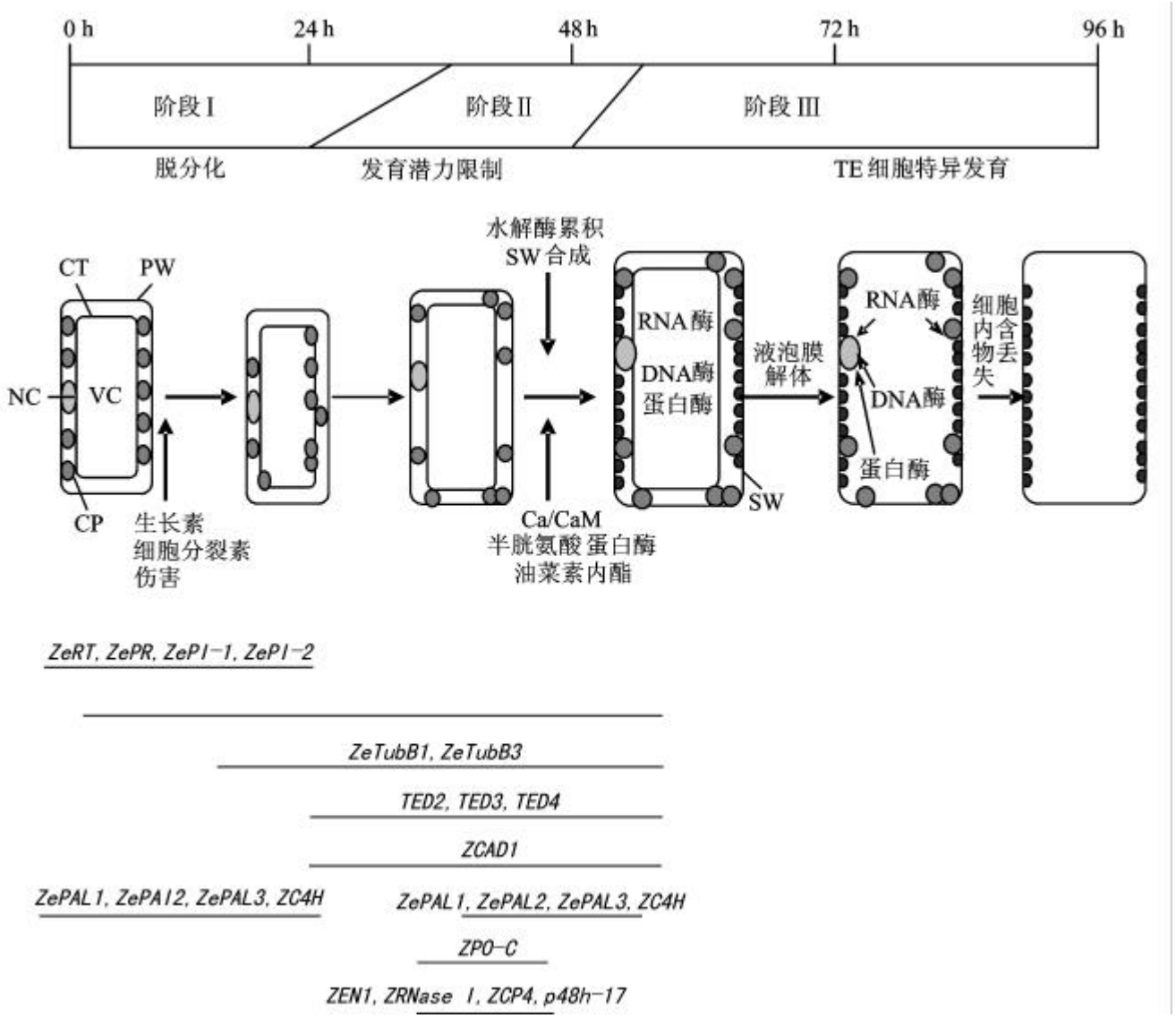


图 1.4　百日草叶肉细胞向 TE细胞分化的主要调控过程
（引自 Fukuda, 1997）

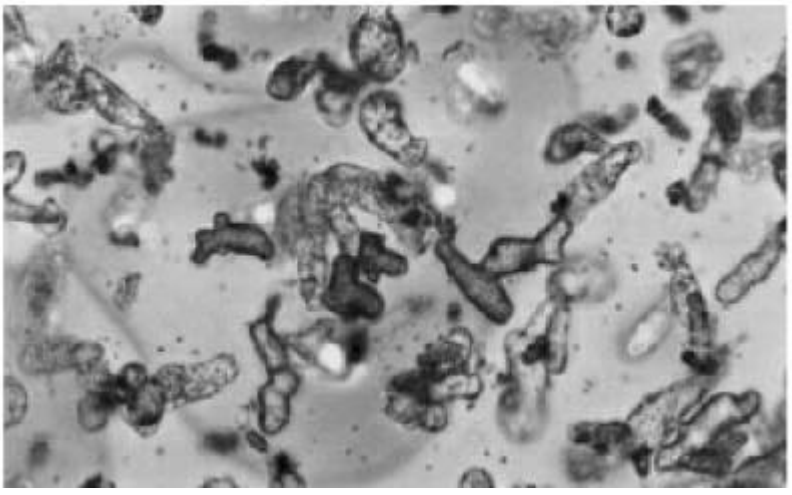


图 1.5　由百日草叶肉细胞分化形成的 TE细胞
（引自 Motose, 2001）

中,此时 TE细胞长轴两端穿孔与另一细胞连通,进一步形成完整的疏导组织。在此期间,一些与细胞壁成分合成相关的酶基因进一步表达,涉及到细胞程序性死亡的基因(TED2、TED3、TED4)亦启动表达(Fukuda, 1996)。

从图 1.4还可以看出,有些基因可能具有多效性,如涉及到苯丙氨酸途径的基因(ZePAL1、ZePAL2、ZePAL3、ZC4H)在 3个阶段都表达,早期表达属于受伤诱导反应,而后期表达则与次生壁形成有关。进一步研究证明,TE细胞分化涉及到复杂的发育和环境诱导的信号传递引起的基因级联表达体系。Demura等(2002)采用微矩阵分析方法,对百日草叶肉细胞分化成 TE细胞过程中的所有表达基因进行了分析,结果显示,在整个分化过程中涉及到 523个基因在不同阶段的表达,其中直接参与分化调控的基因有 258个,包括光合作用相关蛋白基因、核糖体蛋白基因、细胞壁代谢相关基因、木质素合成酶基因以及蛋白酶、核酶和蛋白激酶基因等。

TE细胞分化研究表明,细胞分化是一个复杂的调控过程,根据细胞形状、体积、结构和组织化学成分等方面的差异,对于一个植物个体来讲,大约有 40种不同类型的细胞,每一类型的细胞可能均有独特的分化程序。因此,有关细胞分化的机理还有待于进一步研究。

4. 激素在细胞分化中的调控作用

激素在植物生长发育中具有重要的调控作用,也是离体培养条件下调控细胞脱分化和再分化的主要因素,其中生长素和细胞分裂素是两类主要的调控培养条件下细胞生长和分化的植物激素。此外,在有些试验中也显示,赤霉酸(GA_3)、脱落酸(ABA)和乙烯(ETH)等也在细胞分化中起到一定的调节作用。

早期实验表明,生长素能刺激木质部的发生。1949年,法国植物学家 Camus把一种菊苣小的营养芽嫁接在其根的组织培养物的上表面,几天以后,处于芽下的薄壁细胞中分化出了维管束。这些维管束与芽的维管组织相接在一起。同时,他在愈伤组织表面放置一片玻璃纸,在玻璃纸上再放置芽,切断了愈伤组织与芽之间的直接接触,结果维管组织的分化依然发生。这个试验表明,芽对维管组织的分化有刺激作用,这种刺激作用必然是由一种或几种扩散性的化学物质引起的。1955年,Wetmore和 Sorokin进行了另一试验,证明上述有刺激作用的物质是生长素。他们采用洋丁香未分化的愈伤组织为试验材料,设计了两个试验处理,一是取一块愈伤组织,上面开一个“V”型缺口,另将一营养芽下端削成楔型,嵌在愈伤组织的缺口中,经过 20~30 d的培养,处在芽下面的愈伤组织细胞在芽的诱导下发生分裂,然后先由一些细胞形成了若干短的立柱状结构,后来即发育成维管组织。另一处理是将愈伤组织接种在含有蔗糖和生长素的琼脂培养基上,同样能有效地诱导维管组织的分化,从而直接证明了生长素对维管的分化作用。

以后的试验证据表明,细胞分裂素也与木质部的发生有关。1964年 Bergmann证明,若在含有 5%椰子汁的培养基中加入一定浓度的激动素,可使烟草愈伤组织的导管分化提高 30%。以后众多的植物离体培养也证明,细胞分裂素和生长素对于细胞生长和分化具有同等重要的作用。

进一步研究证实,生长素和细胞分裂素对于细胞生长与分化具有协同作用,它们的量与比值的不同配合,对细胞分化起着重要的调节作用。在已知含有不同激素水平的胡萝卜外植体的培养体系中,生长素和细胞分裂素对于胡萝卜细胞分化同等重要。然而,由于外植体本身内源激素

水平的差异，从而对外源添加这两种激素的培养反应不同，从而解释了在不同研究中所报道的外源激素对培养物影响差异较大的原因（Mizuno和 Komamine, 1978）。在离体条件下，如果用生长素和细胞分裂素处理的顺序不同，其作用也不一样。如果先用生长素处理，后用细胞分裂素处理，则有利于细胞分裂而不利于细胞分化。反之，则有利于细胞分化。如果两者同时处理，则可提高分化频率。在菊芋（Helianthus tuberosus）块茎培养中发现，细胞分裂素对细胞分化的作用在于它能提高生长素作用的敏感性。

尽管近年来由生长素和细胞分裂素诱导表达的基因已在许多植物或培养物中克隆出来，但有关生长素与细胞分裂素在离体培养中的协同作用机理仍不十分清楚。Dominov等（1992）从一个烟草（Nicotiana plumbaginifolia）的悬浮培养细胞系中分离到一个同时可被生长素和细胞分裂素诱导表达的 cDNA pLS216。诱导表达试验显示，加入生长素（2, 4－D, 2, 4－苯氧乙酸）只引起 pLS216 mRNA的短暂积累，而同时加入外源 BA则可引起转录积累，虽发生时间较迟，但可持续转录。因此他们也认为，细胞分裂素可能增加了细胞对生长素的敏感性，或者能阻断生长素的反馈抑制。在另一个生长素诱导表达基因 p48h－10的调控研究中，也证明细胞分裂素在细胞分化中的作用是通过增强生长素的作用实现的。在百日草叶肉细胞培养中，单独使用 IAA时，在培养 48 h后才检测到 p48h－10的表达，而与 BA同时使用时，培养 24 h即可检测到该基因的表达，只使用 BA则不能启动该基因的表达。组织印迹检测显示，p48h－10只在茎和根的维管束中表达，而在分生组织中不表达（Ye和 Varner, 1994）。这一结果较直接地证明了生长素与细胞分裂素在细胞分化中的协同调控作用。

除了生长素和细胞分裂素外，赤霉素（GA）、乙烯和脱落酸等植物激素在细胞分化中的作用也有报道。但是，在培养条件下，这些激素的作用在不同的实验中往往出现较大的差异，有些甚至是完全相反的结果。因而认为，它们在离体培养中并不是必需的基本调节物质。近年来亦有研究认为，BR（brassinosteroid，油菜素内酯）可能在细胞分化中具有一定的作用，特别是在百日草 TE细胞分化中，可检测到 BR的大量增加（Yamamoto等，2001）。拟南芥、豌豆以及番茄等作物的 BR缺乏突变体发育研究表明，BR生物合成途径阻截的突变体，在形态上均出现不同程度的畸形变异（Altmann, 1999；Li和 Chory, 1999）。到目前为止，已在 60个种的植物中鉴定出 40种不同类型的 BR。然而，在许多植物外源饲喂 BR的试验中发现，由于植物组织以及培养条件的不同，各种类型 BR所表现出的生理活性和功能有较大差异。因此，BR作为离体培养中生长和发育调控的基本激素，目前还没有一个稳定的分子形式。

越来越多的研究显示，植物激素对细胞生长与分化的调控是一个复杂的级联调控过程。应该注意到的是，在植物中细胞种类的不同或同一种细胞不同的发育状态，均会影响细胞对激素的反应。因此，在离体培养条件下，由于外植体细胞所处的生理状态不同，其内源激素水平也存在较大差异，试图寻找外源激素水平在分化中作用的共同模式可能是很困难的。

细胞脱分化和再分化是离体培养过程中细胞全能性表现的基本过程，了解这一过程的调控机理，最终是为再生个体奠定基础。生物个体形成是通过形态发生（morphogenesis）实现的，建立在离体培养基础上的形态发生称之为体细胞形态发生（somatic morphogenesis）。体细胞形态发生过程及其调控机理是细胞工程学研究的核心内容。与个体水平上的形态发生不同，培养条件下的形态发生不是起源于合子，而是起源于培养细胞。在培养条件下，植物细胞经过再分化形成完整个体可以通过两种途径：一是器官发生（organogenesis），二是体细胞胚胎发生（somatic em-

bryogenesis)。

第二节 器官发生

植物的离体器官发生是指培养条件下的组织或细胞团(愈伤组织)分化形成不定根(adventitious roots)、不定芽(adventitious shoots)等器官的过程。在自然界,许多植物的无性繁殖如扦插繁殖、嫁接繁殖等,均属于器官发生的发育方式。但在自然条件下的器官分化过程受植物繁殖体本身的自主调节控制,而在离体培养条件下,植物细胞的各种生命活动均是在人工辅助调节下完成的。因此,离体培养下器官发生的难易,往往取决于研究对象的培养技术成熟程度及其调控机制基础研究的深度。

一、离体培养中器官发生的方式

通过器官发生形成再生植株大体上有3种方式(图1.6)。第一种方式是先芽后根。即先分化芽,芽形成之后,在芽的基部长出根进而形成完整植株,这是植物离体培养中较为普遍的一种植株再生方式。第二种方式为先根后芽。即先分化根,再在根上产生不定芽进而形成完整植株。许多研究证明,培养物中如果先形成根则往往抑制芽的形成,因此在多数培养中,通常通过分化培养基的调控来促进先形成芽。但也有例外,早期在颠茄细胞悬浮培养时发现,细胞团上先产生根原基突起,随即形成像钉状的根。这些钉状根可以从细胞团上脱落下来分散在培养基中,随后与根尖相对的另一端分化出芽,并进一步发育成完整植株。第三种方式是在愈伤组织的不同部位形成芽和根,再通过维管组织的联系形成完整植株。这种再生方式在许多植物离体培养中均有出现,它们的芽和根一般是同步发生的,也可能略有先后,在进一步的发育过程中,芽中的维管组织向下分化,最后芽和根的两种维管组织相互连接,形成统一的轴状结构,进而形成完整再生植株。

器官发生再生个体在多数情况下建立在愈伤组织培养的基础上,通常在同一个培养体系中会同时出现上述几种器官发生方式。由于在培养初期往往使用较高浓度的生长素,因此在诱导器官分化的初期常常会分化不定根,此时应及时调整激素比例,以促进不定芽的形成。有关激素

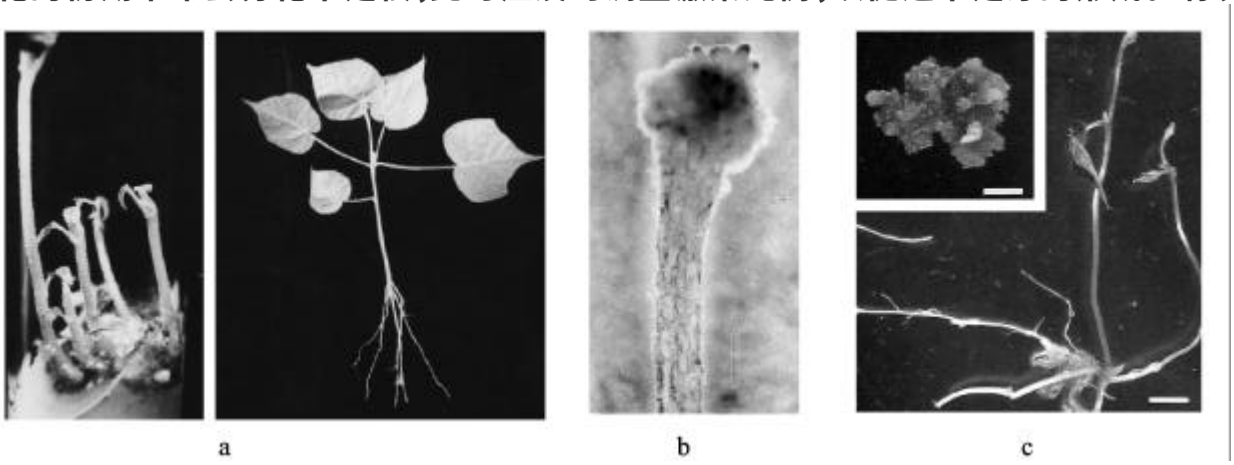


图1.6 培养条件下器官发生方式
a.先芽后根;b.先根后芽;c.根芽同步发生
(引自 a. Sunnichan, 1998; b. Tylicki, 2000; c. Zambre, 1998)

对分化方式的影响本节稍后专题介绍。

二、器官分化过程

培养外植体再生个体可以直接由外植体某些细胞转分化（transdifferentiation）形成，也可以通过愈伤组织介导形成，即先诱导外植体形成愈伤组织，然后通过再分化形成。特别是在花药、花粉、单细胞以及原生质体培养体系中，愈伤组织形成是必需的过程。

离体培养条件下，经过愈伤组织再分化器官一般要经过 3个生长阶段。

第一阶段是外植体经过诱导形成愈伤组织。愈伤组织实质上就是一团无序生长的细胞，这些细胞大多处于随机分裂状态。组织学研究显示，处于非分化状态的愈伤组织细胞均为近圆形的液泡化薄壁细胞，蛋白质含量少，细胞器不发达。组成同一愈伤组织的细胞大小不均一，处于表面或者说外围的细胞体积较小，越往愈伤组织中间的细胞越大。

第二阶段是“生长中心”形成。当把愈伤组织转移到有利于有序生长的条件下以后，首先在若干部位成丛出现类似形成层的细胞群，通常称之为“生长中心”，也称为拟分生组织，它们是愈伤组织中形成器官的部位。处于“生长中心”的细胞体积小，细胞质稠密，蛋白质合成丰富，液泡逐渐消失。研究显示，“生长中心”形成是器官发生的一个转变时期，此时细胞从无序生长转为有序生长，这种转变通常首先发生于那些感受态细胞（competent cell）。感受态细胞首先进行一次定向分裂，随后即进入快速分裂期，进而在愈伤组织中出现排列有序的成束的致密细胞团。

第三阶段是器官原基及器官形成。“生长中心”形成后，按照其已确立的极性，某些细胞开始分化形成管状细胞，进而形成维管组织。“生长中心”部位开始形成不同的器官原基，进而分化出相应的组织和器官。1958年，Steward等曾详细介绍过胡萝卜培养物的分化过程。在胡萝卜悬浮培养物中能形成若干生长中心，在每个“生长中心”的中央含有管胞，其周围是类似形成层的细胞。随后，由这些“生长中心”的中央细胞发育成根，再把这些长根的“生长中心”转移到半固体培养基上以后，在离根尖很远的另一端上形成芽，以后在根和茎之间形成维管束，从而形成完整植株。在大多数固体培养条件下，愈伤组织分化不定芽通常首先是由表层细胞分裂形成茎芽原基，再发育成完整植株（Reuther, 1984；Redway, 1994）。

在有些情况下，外植体不经过典型的愈伤组织即可形成器官原基。这一途径有两种情况：一是外植体中已存在器官原基，进一步培养即形成相应的组织器官进而再生植株，如茎尖、根尖分生组织培养；另一种情况是外植体某些部位的细胞，在重新分裂后直接形成分生细胞团，然后由分生细胞团形成器官原基。这种不经过愈伤组织直接发生器官的途径在以品种繁殖为目的的离体培养中具有重要的实践意义。Lo等（1997）在非洲紫罗兰的一个杂交品种 Virginia叶片培养中，详细观察了由叶肉细胞直接再生芽的过程（图 1.7）。叶片培养 3～5 d，叶片表层的某些细胞进行一次平周分裂（包括叶正面和背面表层细胞，图中分别示为 Ad和 Ab），在以后的 5 d里，其中一个子细胞连续进行几次平周分裂和垂周分裂，形成“生长中心”。“生长中心”细胞进行活跃的细胞分裂和生长，大约 20 d以后原初器官原基形成，再进行大约 5 d的培养即形成芽原基。

研究表明，在叶肉细胞再生植株过程中，最初分裂细胞的第一次分裂轴向是十分重要的。在不经过愈伤组织的器官分化中，这次平周分裂既是叶肉细胞的脱分化，同时也是该细胞转变发育方式极性的确定。现在，有人把最先启动分裂的这些细胞称之为感受态细胞。在培养过程中，这些感受态细胞可以对外部环境信号作出早期反应，引起细胞进入特殊的发育途径，通过细胞分

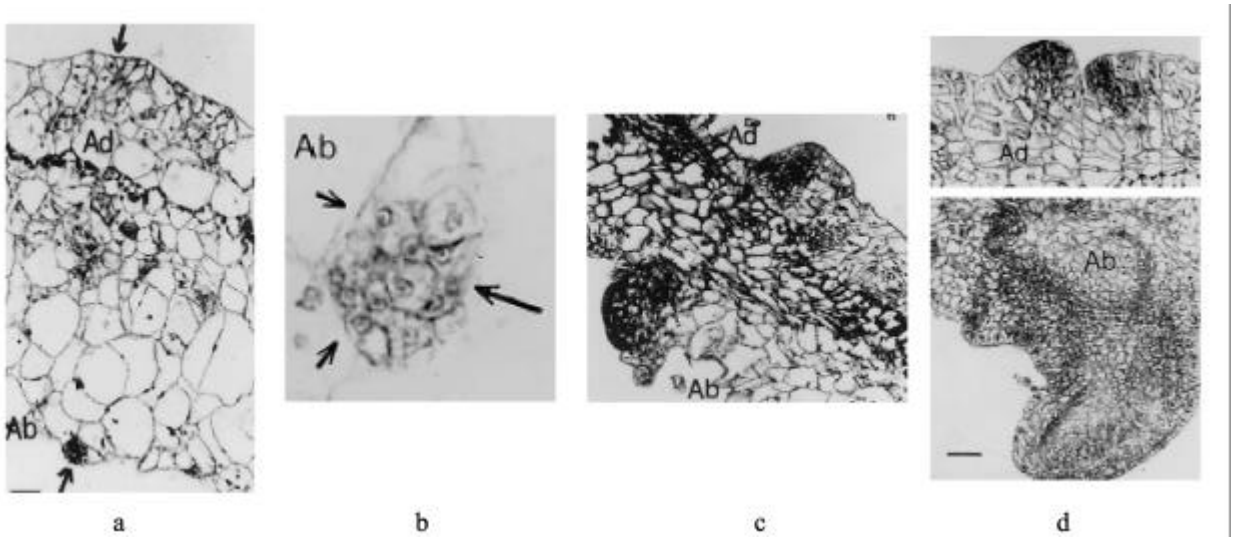


图 1.7 非洲紫罗兰 (Virginia) 叶片直接发生不定芽的组织学变化
a.细胞第一次平周分裂;b."生长中心"形成;c.原初分生组织;d.芽原基形成
引自 Lo等,1997)

裂,或形成愈伤组织,或发生器官,或者发生体细胞胚。

三、起始材料对器官分化的影响

在组织培养过程中,用于培养的外植体恰当与否不仅影响前期诱导能否成功,而且影响器官分化的难易。外植体的影响包括母体植株的遗传基础与生理状态。

1. 母体植株的遗传基础

尽管植物组织培养再生个体已在几百种植物上获得成功,但已有研究证明,不同种属的植物,甚至同种植物不同品种间的培养效果均有较大差异。总体上说,被子植物比裸子植物容易培养,在被子植物中又以茄科、秋海棠科、景天科、苦苣苔科以及十字花科植物培养成功的报道最多。通常情况下,在自然条件下以无性繁殖为主的植物,在培养条件下也有较强的器官分化的能力 (Pierik, 1987)。

同种植物不同品种 (基因型) 的培养效果具有较大差异已是不争的事实。即使是认为最易培养的植物,有些基因型仍然很难培养成功,例如烟草中的"朗式烟草"即是一个典型的例子。表 1.1反映了几个经济作物不同基因型诱导愈伤组织和再生植株的差异。可以看出,无论是单子叶植物还是双子叶植物,基因型对于培养反应的差异均存在,其中器官分化能力的差异大于愈伤组织诱导的差异。Zhang等 (1998) 曾对 123个大白菜品种进行了再生体系筛选,结果显示,基因型间芽再生能力具有显著差异,最高的可达 97%,而有些基因型则不能再生植株。

通常把组织培养反应的差异的现象称之为顽拗性 (recalcitrate),产生这种现象的机理目前仍不清楚,推测可能的原因是在植物中存在有某些与培养反应有关的基因调控机制。不同基因型启动这些调控机制的敏感性不同,从而造成对培养反应的差异。Berrios等 (2000) 以两个器官再生能力完全不同的向日葵品种为亲本,构建了一个近交系群体,通过对群体中 75个重组系和亲本的离体培养器官发生研究,建立了与离体器官发生相关的 AFLP分子标记图谱。研究分析显示,器官分化能力受微效多基因控制,且具有加性效应。

表 1.1 不同基因型器官分化能力的比较

植物种类及外植体类型	基因型品种/自交系)	愈伤组织诱导率/%	器官分化率/%	资料来源
大豆:上胚轴	汾豆 33	94	34	程林梅等,2001
	晋豆 19	93	28	
	晋遗 21	91	22	
	晋豆 11	93	20	
	汾豆 38	93	23	
	汾豆 17	93	23	
	汾豆 51	92	16	
	晋早 125	91	12	
甘薯:叶片	济南红	100	22	张宝红,1993
	宁-331	100	9	
	千系-682	11	0	
小麦:幼胚	鄂麦 12	98	36	覃建兵和何光源,2001
	鄂恩 1号	96	32	
	89-11	10	4	
	绵阳 26	100	4	
	鄂 55072	100	4	
	荆 35	100	12	
玉米:幼胚	340	100	78	杜娟等,2002
	7922	100	86	
	Mol17	100	62	
	4112	100	53	
	8902	100	57	
	846	100	38	
	477	100	47	
	吉 853	100	11	
	吉 921	100	32	
	444	100	0.4	

2. 外植体的类型

外植体对诱导反应及其再生能力的影响体现在外植体的生理状态上。总体来讲,生理状态年轻,来源于生长活跃或生长潜力大的组织和器官的细胞更有利于培养,但具体到不同的植物类型则有较大差异。对于多年生植物而言,以幼嫩组织为材料无论是诱导还是分化均较容易,而以较老组织为外植体的培养物分化则相对困难些。有性繁殖植物在通常情况下以胚或幼嫩果实为外植体较好,一二年生无性繁殖植物的取材则可塑性较大,但仍以自然繁殖器官为外植体更易成功。

外植体选取合理与否,不仅影响培养的难易,而且有时甚至影响分化的程度和器官类型。

1974年 Tran Thanh Van等取烟草正在开花的植株的薄层表皮进行培养,结果不同部位的表皮外植体所形成的芽的类型不同。在一定的培养条件下,来自花枝的表皮只能形成花芽,来自植株基部的表皮则只形成营养芽,而由中间部位的表皮培养,则可同时形成两种类型的芽。我们在培养Yam (非洲薯蓣)的根时发现,由根形成的愈伤组织比茎形成的愈伤组织更易分化根。即使是同一器官不同部位的组织,其再生器官的能力也不同。如在以百合鳞茎为外植体的培养中,取鳞茎基部为外植体培养具有较强的再生能力,而鳞茎顶端为外植体则分化能力较弱。在以魔芋种子为外植体的培养中也发现,当取魔芋种子靠芽的顶部为外植体时,可以直接发生小块茎进而形成植株;当取种子中部为外植体时,则先形成愈伤组织,然后在某些部位分化小块茎;而取种子基部为外植体时,愈伤组织形成能力和其后的器官分化能力均显著降低(柳俊等,2000)。

在有些情况下,外植体的取材方式还影响植株的再生途径。如梧桐(Sterculia urens)培养中,如果取带腋芽的嫩茎段为外植体,则以器官发生途径再生植株。如果以不带腋芽的茎段为外植体,则可以体细胞胚胎发生途径再生植株(Sunnichan等,1998)。对于一些具有变态器官(如鳞茎、球茎和块茎等)的植物,在组织培养中往往也容易形成相应的变态器官。如在百合、水仙等鳞茎类植物培养中往往易形成小鳞茎,在草石蚕、马铃薯等块茎植物培养中则可观察到块茎的形成。这一特性也使以变态器官为繁殖材料的植物,可以实现种用材料的工厂化生产,最典型的例证是马铃薯试管种薯的研究,已使马铃薯脱毒种薯繁殖技术工厂化,开始应用于马铃薯生产。

四、激素对器官分化的调控

激素在细胞生长与个体发育中具有重要的调控作用。离体培养下的器官分化,在大多数情况下是通过外源提供适宜的植物激素而实现的。在众多的植物激素中,生长素与细胞分裂素是两类主要的植物激素,在离体器官分化调控中占有主导地位。

早在1948年,Shoog和崔澄就首先报道了在烟草的组织培养物中器官的分化受激素控制。通过调整培养基中IAA和腺嘌呤或激动素(KT)之间的平衡关系,可以在一定程度上随意诱导根和芽的分化。当IAA与激动素的浓度比例高时有利于根的形成,比例低时有利于芽的形成。关于激素调控器官形成的这一模式,已在许多植物的离体培养中得到验证。Vardjan和Nitsch在菊苣根的再生中观察到,在芽形成的部位含有较高水平的内源细胞分裂素,而在根的形成部位生长素占优势。进一步研究表明,离体培养中,外源添加生长素与激动素的比例因植物种类、培养类型、培养时期不同而异,这取决于各种培养物内源激素的水平。研究证明,外源激素通过调节内源激素的平衡状态而控制器官发生,因此,在进行组织培养的过程中,器官分化的激素配比可能很难有一确定的浓度,这亦是某些培养类型重复性较差的原因之一。

此外,赤霉素对于器官分化亦具有一定的调节作用,在适宜的浓度下有利于芽的伸长生长。在大多数情况下,分化培养基勿需添加外源赤霉素,但有些植物在分化芽的过程中,还需加入一定浓度的赤霉素。这是因为对于大多数培养物来讲,其本身的内源赤霉素水平已可以满足分化的需要,而少数植物则相反,其内源赤霉素水平相对较低,这时就需要加入适当的外源赤霉素以满足芽分化的需要。但许多研究显示,赤霉素对器官发生具有抑制作用,这一现象亦可能与培养物本身内源赤霉素含量较高有关,因为大多数植物激素在高浓度状态下,均表现出生长抑制或毒害作用。

近年的研究显示,前述的植物多肽PSK不仅具有促进细胞分裂的作用,同时也参与器官分

化的调控,添加 PSK可以极大地加强基本激素的作用效果。在蓝猪耳草 (Torenia fournier)茎段培养中,如果只有生长素存在,外植体能分化不定根,当添加 PSK以后,则可大大提高不定根的分化率。而只有细胞分裂素存在时,外植体分化不定芽,当加入 PSK以后,则不定芽的分化率显著提高。在金鱼草愈伤组织诱导不定根和不定芽分化中也观察到相同的现象 (Yang等,1999)。

离体培养中,外源激素在细胞内的吸收和代谢影响到激素的活性从而影响其培养效果。高效液相色谱与酶联免疫结合的分析显示,外源细胞分裂素被外植体吸收后,在细胞内首先被修饰和转化形成多种分子形式,包括活化形式和钝化形式。在烟草组织和细胞培养中发现,添加在培养基中的 BA、玉米素可以很快被外植体吸收,其中一部分迅速转化为核苷、核糖核苷形式 (谷瑞升等,1999)。 Christine等 (1991)在烟草细胞悬浮培养中,使用不同分子形式的玉米素,结果发现它们在进入细胞体内后,大多被转换成各自的核苷形式。一般认为,细胞分裂素自由碱基形式是活性形式,而核苷形式为钝化形式,细胞分裂素进入细胞后转化成核苷形式是降低其活性的主要原因。研究认为,通过细胞分裂素氧化酶对侧链的修饰,可能是植物组织细胞中细胞分裂素活性降低的主要机制。在烟草细胞培养中使用二氢玉米素比使用玉米素更为有效,可能因为二氢玉米素核糖苷不是细胞分裂素氧化酶的底物。因此,细胞分裂素自由碱基形式与核苷形式相互转换的酶学机制,可能是植物细胞内细胞分裂素活性的重要调控机制。

生长素进入细胞后,一部分以游离状态存在,另一部分则与氨基酸结合形成生长素-氨基酸复合体。与生长素结合的氨基酸主要为天冬氨酸,也有谷氨酸。2,4-D、NAA、IAA是常用的3种生长素,前两种为化学合成生长素,IAA为生物合成生长素,植物细胞本身也具有合成 IAA的能力。Ribnicky等 (1996)的研究显示,由于生长素种类不同,形成生长素-氨基酸复合体的量具有显著差异,从而表现出不同的外源生长素在培养效果上的差异。研究认为,与细胞分裂素相似,生长素的复合体形式是钝化形式,而游离形式才具有诱导和调控作用,培养效果与游离生长素的含量成显著正相关。2,4-D在进入植物体后,能够持续地以游离形式存在,与氨基酸的结合量很少。但 IAA进入细胞后大多与氨基酸结合形成复合物,游离形式很少。NAA则介于二者之间 (表 1.2)。早期研究认为,生长素进入细胞或组织后,会影响内源生长素的代谢。进一步的研究表明,2,4-D既不影响内源 IAA合成,也不影响 IAA的分解。而 NAA可能对于 IAA的合成具有反馈抑制效应。只有 IAA既影响内源 IAA的合成,也影响 IAA的分解代谢。因此,不同生长素可能具有不同的作用方式。

表 1.2 外源生长素在胡萝卜上胚轴培养细胞中的总量和游离生长素含量

培养时间	外源生长素浓度/(ng/g FW)		
	生长素	游离形式	总浓度
1周	2,4-D	23 247.4±3 912.7	21 979.4±2 526.3
	NAA	99.3±9.7	1 776.7±50.1
	[$^2H_4$]IAA	30.3±3.5	7 557.0±279.0
4周	2,4-D	20 003.8±4 365.9	33 119.4±3 835.0
	NAA	64.8±17.5	1 637.0±509.8
	[$^2H_4$]IAA	3.4±1.4	763.5±420.0

引自 Ribnicky等,1996

近年来的研究还证明,植物激素对生长发育的调控是通过复杂的信号转导途径实现的,不同

的生长素均具有各自独立的生长素受体。这些研究指出,尽管不同生长素在离体培养中具有类似的作用,但它们调控细胞生长与分化的途径和方式可能存在较大差异。对于各种生长素作用方式和调控途径的深入了解,将对离体培养中器官分化的有效调控具有重要意义。

五、光照对器官分化的影响

光照是离体培养中比较复杂的调节因子,光照时间、强度以及光质对器官分化均有影响。然而事实上,不同植物对光照的精确要求并不清楚。离体培养中光照的控制一般是分阶段进行的。诱导培养中通常不给光照或只提供弱的散射光,以有利于愈伤组织形成。进入分化阶段后则给予较强的光照,其光照时间一般为每天 14~16 h。研究认为,连续的光照有利于培养细胞维管组织的形成,而一定的昼夜光照周期则有利于极性建立和形态发生。

由于培养条件下光合作用能力较低,因此光照的作用更大程度上是调节细胞的分化状态,而不是合成光合产物,在早期的研究中已证明这一点。一些特殊器官发生的实验证明,光周期对器官发生起到了重要的调节作用,如马铃薯离体培养中,在每天光照 16 h条件下有利于试管苗生长,而在每天光照 8 h条件下则促进试管块茎的形成(柳俊等,1995)。

光照对器官发生的调节可能与其对培养物内源激素平衡的调节有关。在一些不改变培养基激素配比的试验中观察到,当把愈伤组织从黑暗转移到光照条件下培养时,内源玉米素的浓度增加,接下来器官分化也随之发生。光照还可能影响生长素的信号转导系统,调整生长素的极性运输,从而引起器官分化(Tian和 Reed,2001)。在细胞分化中已经详细叙述过,光照对于器官发生初期的细胞分化和极性建立具有重要调节作用。同时,光照还有利于维管系统的有序发育。Morini等(2000)认为,光质对器官分化的影响可能与光受体的精确调节系统有关。

六、器官发生的基因调控

离体条件下的器官发生,是细胞对众多培养因子调控的反应而最终引起相关基因表达的结果。这一过程究竟涉及多少基因,这些基因通过何种表达方式调控器官发生等问题,目前还不完全清楚。但是,在过去的近 10年中,通过突变体或分化培养早期相关基因表达的研究,已分离鉴定出一些与芽分生组织形成有关的基因,这些基因在器官分化的各个阶段中,对细胞分化和组织建成具有不同的调控作用。

同源框(homebox)基因是涉及到多细胞生物组织形态建立的一类同源异型基因,编码一保守的 DNA结合同源异型域(homedomain),这些同源异型域蛋白作为转录因子调控相关基因的表达。植物 homebox基因已从许多种植物中分离出来,基于它们的序列同源性可划分为不同的基因家族。Kn1(KNOTTED1)是从玉米中鉴定出的第一个植物 homebox基因。研究表明,它在植物发育过程中起到了重要的调节作用(Vollbrecht等,1991)。根据序列同源性和表达形式,Kn1-like homebox(knox)基因又可分为二组(classⅠ和 classⅡ),classⅡ knox在各种分化组织器官中均表达,而 classⅠ knox只在分生组织中表达。研究显示,classⅠ knox的表达涉及到分生组织的形成和叶、花器官的形态发生(Avivi等,2000)。Kn1和 classⅠ knox分别转化烟草和拟南芥的试验显示,转基因植株发生了叶形态的改变和分生组织在叶片上的异位形成(Sinha等,1993;Chuck等,1996)。在玉米和大麦离体培养中,大量不定芽生成的部位也检测到 Kn1基因的大量表达(Zhang等,1998)。一些转 Kn1相似基因的研究表明,转基因植株能大量产生复合芽以及不

定分生组织 (Chuck等, 1996; Lincoln等, 1996)。类似的其它同源域基因如 STM (Shootmeristemless)基因以及它们的直系同源 (orthologues)基因均参与了茎尖分生组织的分化调控。在转Homebox相关基因的烟草植物中还检测到赤霉素含量减少和生长素含量上升的内源激素变化 (Tamaoki等, 1997; Kusaba等, 1998),这也暗示 Homebox基因可能通过一些调节因子 (如激素)介导调控器官分化 (Frugis等, 1999)。

多细胞生物的器官分化伴随着细胞分裂和生长。研究显示,某些细胞分裂周期基因可能参与了发育调控。植物编码细胞周期依赖性激酶的基因 cdc2,在离体培养中对调节细胞进入分裂状态的过程起着关键性作用。玉米和大麦离体培养时,cdc2的表达高峰发生在不定芽形成的过程中,在培养初期的表达量较少。同时,该基因的表达部位处于分生组织的外层细胞,因此认为,cdc2基因对分生组织的形成和维持分生组织状态均有重要作用 (Zhang, 1998)。在甜菜贮藏器官的发育中也观察到,cdc2基因的表达与甜菜块根次生分生组织形成有关 (Fowler等, 2000)。近年来,直接从一些离体培养体系中也克隆出几个与器官形成有关的基因。Banno等 (2001)从拟南芥根培养再生芽的体系中克隆了一个增强芽再生能力的基因 ESR1,将该基因与 35S启动子连接转化拟南芥,在有细胞分裂素存在的情况下,转基因外植体可以显著提高不定芽的分化率。而生长素不能诱导该基因表达,同样也不能提高不定芽分化频率。

在一个台湾泡桐 (Paulownia kawakamii)叶片培养再生体系中,Low等 (2001)通过 RT-PCR技术克隆了一个含有亮氨酸拉链的基因 bZIP (PKSF1),该基因编码一个亮氨酸拉链转录因子,其表达发生在芽形成之前,在有不定芽形成的愈伤组织中其表达量比非分化愈伤组织高 6倍 (图 1.8)。

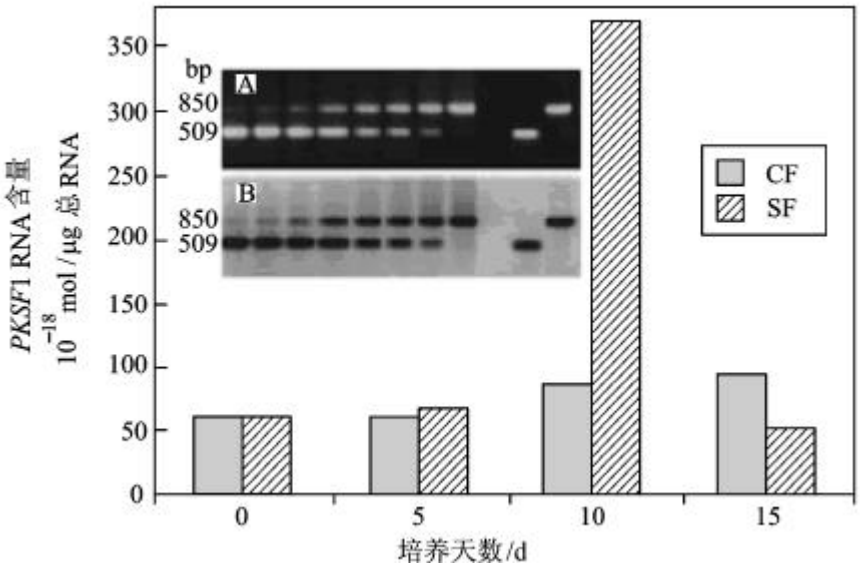


图 1.8 PKSF1在非分化愈伤组织 CF和不定芽分化愈伤组织 SF中的表达
(引自 Low等, 2001)

拟南芥温度敏感型突变体研究显示,在植物基因组中存在有与离体培养器官形成有关的基因,如果这些基因发生突变,即会丧失离体器官发生能力。从烟草温度突变体中鉴定出 3个与离体器官发生有关的基因 SRD1、SRD2和 SRD3,当它们发生隐性突变时,在离体培养中表现出器官发生在不同时期受阻。这 3个基因均定位于拟南芥 I号染色体上。

事实上,离体培养中器官发生的调控不仅涉及到直接与器官发生相关的基因,同时还涉及到与激素、光照等培养条件反应相关的基因表达。

第三节 体细胞胚发生

植物的胚胎发生是从合子开始的,但在离体培养中经常观察到,许多培养物在个体再生时经过类似于合子胚的发育形式,先形成胚的类似结构,再生长发育成完整植株。离体培养中,这一个体再生途径在各种培养类型中均可观察到,包括体细胞培养和生殖细胞培养。因此,我们把离体培养下没有经过受精过程,但经过了胚胎发育过程所形成的胚的类似物(不管培养的细胞是体细胞还是生殖细胞),统称为体细胞胚或胚状体。这一定义有以下几方面的界定:其一,体细胞胚是离体培养的产物,只限于在离体培养范围使用,以区别于无融合生殖胚;其二,体细胞胚起源于非合子细胞,以区别于合子胚;其三,体细胞经过了胚胎发育过程,以区别于离体培养中器官发生形成个体的途径(崔凯荣和戴若兰,2000)。

离体培养条件下体细胞胚发生首先是在胡萝卜中发现的,因而胡萝卜一直是体细胞胚研究的重要模式植物。以后在柑橘属、咖啡属等植物中也相继发现了体细胞胚发生的现象。随着组织培养技术的不断完善和相关调控机理研究的不断深入,通过体细胞胚发生途径再生植株的报道也越来越多。据不完全统计,目前已有属于 30多个科的 80多个种的植物有形成体细胞胚的报道。因此认为,植物体细胞可能均具有胚胎发育的潜力,而这种潜力只有在适宜的培养条件下才能被诱导表现出来。

一、体细胞胚的形成

离体培养下的胚胎发生可归纳为两种途径,即直接途径与间接途径。直接途径就是从外植体某些部位直接诱导分化出体细胞胚,如在山茶、槐树的子叶培养中,直接从子叶基部的表皮细胞或切口处产生体细胞胚。间接途径有两种情况:一是在固体培养中外植体先形成愈伤组织,再分化发育产生体细胞胚;二是悬浮培养中先产生胚性细胞团再形成体细胞胚。

1. 体细胞胚从外植体上直接发生

体细胞胚从外植体上直接发生的报道大多来源于以叶片为外植体的实验,但也有以茎段和胚为外植体形成体细胞胚的报道。早期我国的朱澂(1978)和周俊彦(1981)在山茶和槐树的子叶培养中即观察到体细胞胚的直接发生。近年来,在许多植物的离体培养中,通过培养基和培养条件的调控可以直接产生体细胞胚(Yantcheva等,1998;Chen等,1999;Sarasan等,2002)。

在以叶片为外植体的培养中,体细胞胚的直接形成可分为两个阶段:第一个阶段为诱导期。在此阶段中,叶片表皮细胞或亚表皮细胞感受培养刺激,进入分裂状态。兰科植物的叶片在固体培养基上直接发生体细胞胚的研究显示,在有植物激素(2,4-D和 TDZ)的培养基中,经过大约 20 d的培养,在伤口和叶片表层细胞首先启动细胞分裂,形成小的瘤状突起(图 1.9a)。第二个阶段是胚胎发育期。在这一阶段,形成的瘤状物继续发育,经过球形胚、心形胚等发育过程(图 1.9b),最后形成如图 1.9c所示的体细胞胚。香石竹叶片培养在液体培养基中也可直接诱导体细胞胚发生,其发育过程与在固体培养基上相似,但在球形胚形成后,会从叶片上脱落,需要将其

转移到不含生长素的培养基上让其继续发育。

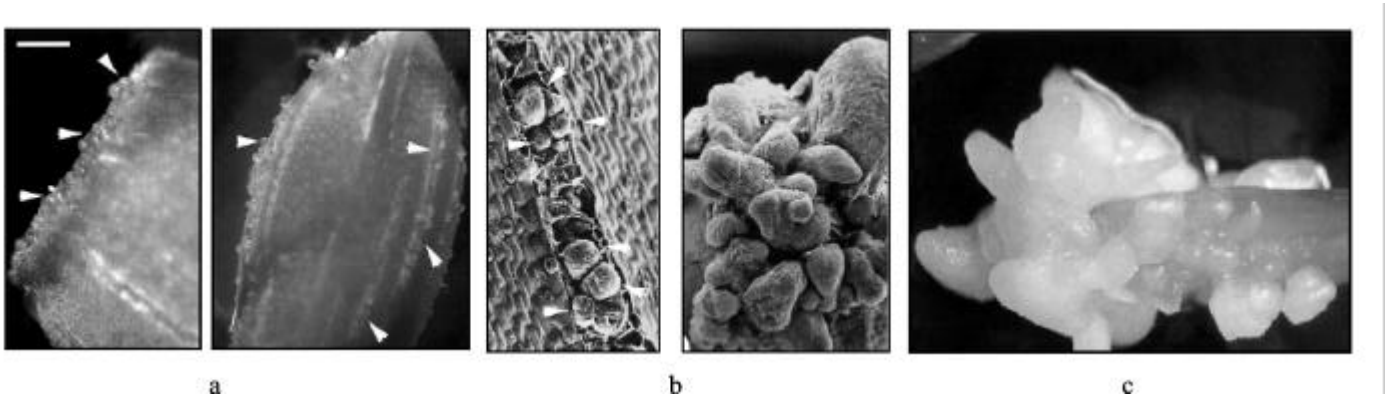


图 1.9　兰草叶片体细胞胚直接形成的过程
a.叶片表面形成小的瘤状突起；b.由瘤状突起发育形成的早期体细胞胚；
c.在叶片上直接形成的体细胞胚
(引自 Chen等，1999)

2. 经过愈伤组织的体细胞胚发生

在大多数情况下，经过愈伤组织的胚胎发生需要 3个培养阶段。第一阶段是诱导外植体形成愈伤组织，第二阶段是诱导愈伤组织胚性化，第三阶段是体细胞胚形成。但在以幼胚、胚以及子叶为外植体时，通常可以直接诱导胚性愈伤组织产生，进而发生体细胞胚。因此，经过愈伤组织的体细胞胚发生，胚性愈伤组织的形成是培养的关键。

大蒜以叶片和根为外植体时，通过愈伤组织形成体细胞胚，经过了上述典型的 3个体细胞胚发生阶段。首先在附加较高浓度的 2,4－D的培养基中诱导愈伤组织产生，然后将愈伤组织转移到降低 2,4－D浓度的培养基中，使愈伤组织胚性化。在维持高浓度和降低生长素浓度的比较培养中显示，当愈伤组织形成后，转入适当降低生长素浓度的培养基中，胚性愈伤组织转化率显著高于继续维持在高浓度生长素培养基中培养的转化率。在 Fereol等 (2002) 的试验中，转化胚性愈伤组织的生长素适宜浓度是初期诱导愈伤组织的生长素浓度的 1/2,在此培养基中已可见少数球形胚形成。胚性愈伤组织再转入胚胎发育培养基中，体细胞胚很快大量产生。胚胎发育培养基应继续降低生长素的浓度。Lin等 (2000) 在以蝴蝶兰种子小苗茎段为外植体的培养中也采用了类似的培养技术，起始培养形成的愈伤组织质地紧密，然后转入胚性愈伤组织诱导培养基上形成较大的颗粒状胚性愈伤组织，进而发生原胚，经过不同时期完成体细胞胚的发育 (图 1.10)。

3. 细胞悬浮培养的体细胞胚发生

从悬浮细胞系中发生体细胞胚的技术体系首先是在胡萝卜中建立的。在胡萝卜细胞悬浮培养中，体细胞胚形成的细胞学观察表明，其培养物中存在两种类型的细胞：一是自由分散在培养基中的大而高度液泡化的细胞，这类细胞一般不具备胚胎发生潜力；二是成簇成团的体积小而细胞质致密的细胞，这类细胞具有成胚能力，因而，把这类细胞团又称为胚性细胞团。胚性细胞团在增殖培养基上可以连续增殖，其增殖方式是通过细胞增殖和细胞团离散进行的。

在一个胚细胞团中包括有两种细胞，处在中央的那些细胞具有一个大液泡，小而致密的核，核仁染色较浅，核糖体数目不多，内质网和线粒体少，无泡囊，脱氢酶活性很低，淀粉粒少。在胚性细胞团的外围，则是成群的非常活跃的分生细胞，这些细胞的特点是具有若干个小液泡，一个

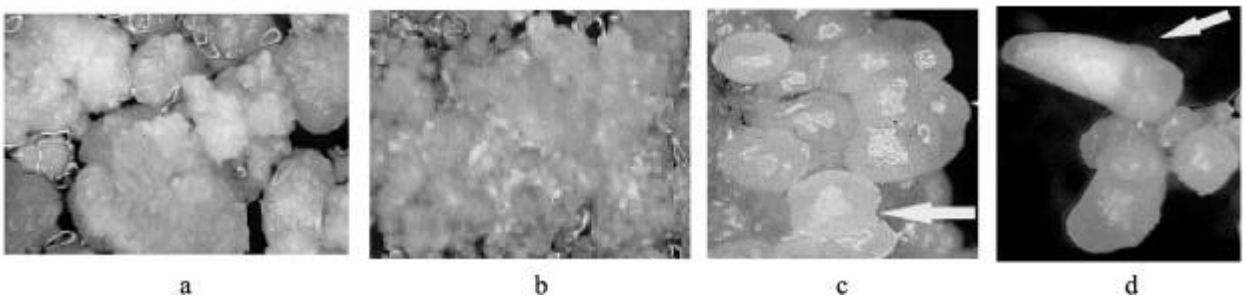


图 1.10 蝴蝶兰茎段外植体经过愈伤组织的体细胞胚发生
a.质地紧密的愈伤组织;b.胚性愈伤组织;c.球形胚形成;d.子叶期胚
(引自 Lin等,2000)

大的细胞核,一个染色鲜明的核仁,核糖体密度较高,具大量的粗糙内质网、线粒体及泡囊,脱氢酶活性较高,含有十分明显的淀粉粒。胚性细胞团的外围细胞不断分裂,而中央细胞体积逐渐增大,彼此分离,从而引起胚性细胞团解体,这时外围分生细胞离散成新的小细胞团,每一个小细胞团又发育成一个新的胚性细胞团。周而复始,这种胚性细胞团即可连续继代增殖。

把胚性细胞团转移到适宜的胚胎发生培养基上,其外围的许多细胞便开始第一次不均等分裂,靠近细胞团方向的一个细胞较大,以后发育成类似胚柄的结构。另一个细胞则继续分裂形成类似原胚的结构,以后经过类似于体内的发育过程,经球形期、心形期等发育阶段形成完整的体细胞胚(李浚明,1991)。

通过悬浮细胞系再生体细胞胚,由于胚性细胞可以继代增殖,因此可以提高胚胎的生产效率。这一体系的关键是要建立适宜的悬浮细胞系。获得好的细胞系可以通过两个途径:一是外植体直接培养在液体培养基中建立悬浮细胞系;二是先将外植体培养在固体培养基上,诱导胚性愈伤组织产生,再将胚性愈伤组织细胞用于悬浮培养。有关悬浮培养细胞系建立的详细情况将在第五章详细介绍。

事实上,目前通过悬浮培养生产体细胞胚已在不同植物中形成了多种技术体系,其区别主要在转入固体培养基的时间上。大多数培养体系是在液体培养基中形成球形胚,然后转入固体培养基,完成以后的胚胎发育过程。但也有报道整个胚胎发育过程均在液体培养基中完成的(Choi等,2002)。在高丽参(*Acanthopanax koreanum* Nakai)的培养中,通过固体培养和悬浮培养相结合,建立了高频率、同步化的体细胞再生体系(Choi,1997)。在这一培养体系中,研究者以*A. koreanum*的嫩茎为外植体,先按常规培养方法诱导愈伤组织形成,然后将愈伤组织转入高浓度2,4-D(4.5 μmol/L)的培养基中,使愈伤组织增殖并转变成颗粒状胚性愈伤组织,然后将胚性愈伤组织转入低浓度2,4-D(0.45 μmol/L)的液体培养基中,待球形胚形成后,再转入不含2,4-D的液体培养基中继续胚的发育(图1.11)。

二、体细胞胚的结构与发育特点

体细胞胚大多首先起源于一个胚性细胞,胚性细胞经过首次分裂形成二细胞原胚,以后经过细胞分裂形成多细胞原胚。在单子叶植物中,胚性细胞的第一次分裂一般为不均等分裂。而在双子叶植物中,胚性细胞的第一次分裂有不均等分裂,也有均等分裂。在大多数情况下,胚性细胞的第一次分裂为平周分裂(Nondhay,1999;Xie和Hong,2001),形成的2个子细胞,处于上部的

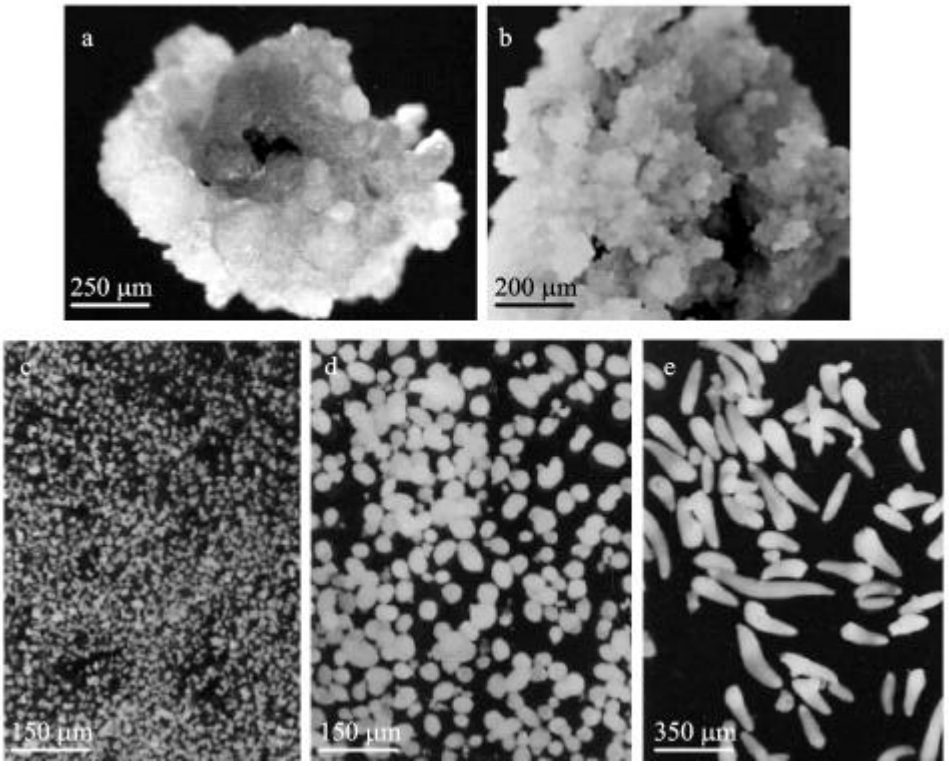


图 1.11　A. koreanum细胞悬浮培养中体细胞胚的发生过程
a.外植体形成的质地紧密的愈伤组织；b.颗粒状胚性愈伤组织；
c.液体悬浮培养的胚性细胞团；d.悬浮培养中的球形胚形成；
e.悬浮培养中成熟体细胞胚
(引自 Choi等，1997)

顶细胞继续分裂形成多细胞原胚，而下部基细胞成为胚柄类似物。

Figueroa等（2002）在咖啡叶片外植体诱导体细胞胚形成的实验体系中，同时观察到直接从叶片外植体发生体细胞胚和经过愈伤组织间接发生体细胞胚的现象。比较两种体细胞胚发生方式的研究显示，在胚性细胞早期分裂发育上表现出一定差异，但球形胚以后二者发育过程相同。从外植体直接发生体细胞胚的方式中，在胚性细胞形成前，叶片亚表层细胞要进行几次活跃的平周分裂，然后胚性细胞在这些活跃分裂的细胞层中产生。胚性细胞的大小与周围细胞相似，但具有一膨大的细胞核（图 1.12a）。胚性细胞经过几次分裂形成原胚，原胚通常被包埋在亚细胞层中。原胚形成后，细胞进行活跃的分裂，很快形成球形胚结构，进而完成胚胎发育（图 1.12b～d）。

从愈伤组织间接发生体细胞胚同样具有与上述相似的胚胎发育特征，但胚性细胞既可起源于表层细胞，也可起源于亚表层细胞。胚性细胞的第一次分裂为均等分裂，接下来 2个子细胞继续均等分裂形成 4个细胞原胚，以后才进入个体发育阶段形成胚形结构，其发育过程类似于动物胚胎早期发育（Fifueroa等，2002）（图 1.13）。

与器官发生形成个体的途径相比，体细胞胚发育再生植株有两个明显的特点：一是体细胞胚具有双极性（double polarity）；二是体细胞胚形成后与母体的维管束系统联系较少，即出现所谓的生理隔离（physiological isolation）现象。细胞学观察显示，胚性细胞在发育过程中，出现细胞壁加厚，胞间连丝消失等变化。胚性细胞分裂形成的多细胞原胚始终被厚壁所包围，与周围细胞形成明显的界限，只通过胚柄类似物与外植体或愈伤组织连接。随着体细胞胚的发育，周围细胞似

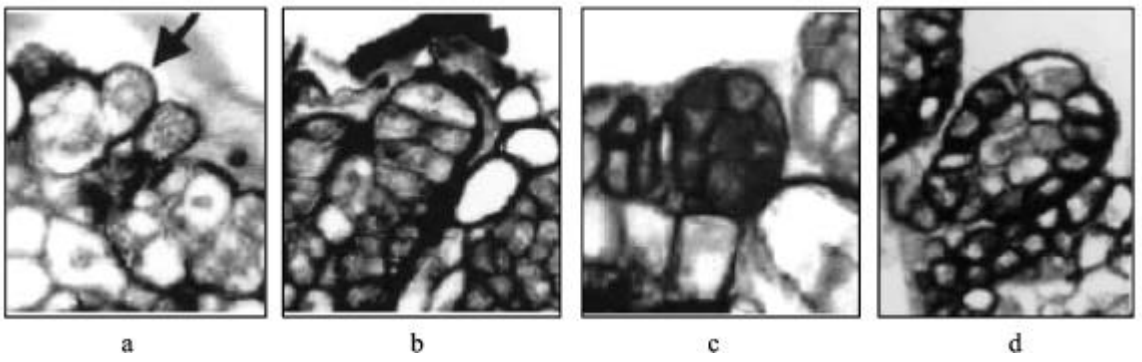


图 1.12 体细胞胚形成的组织细胞学变化
a.胚性细胞产生;b.早期原胚;c.球形胚形成;d.完整胚结构形成
(引自 Figueroa等,2002)

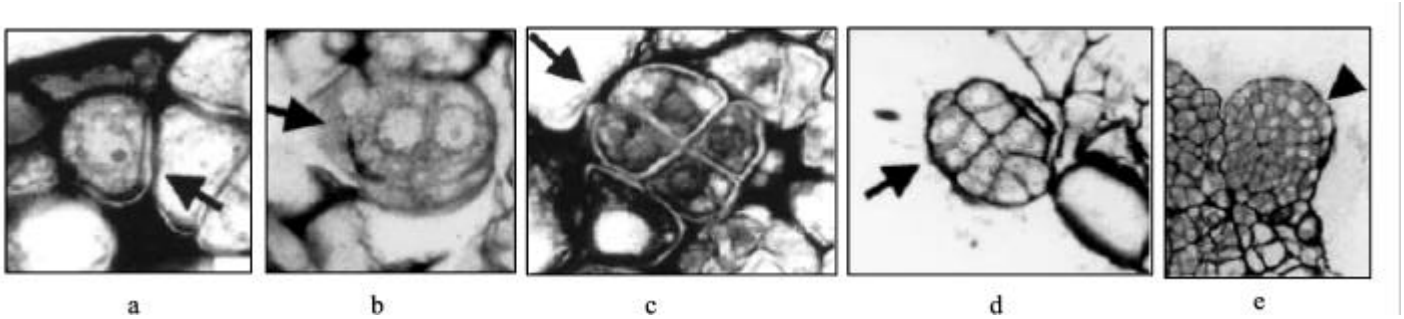


图 1.13 咖啡外植体培养中起源于愈伤组织的体细胞胚早期发育过程
a.胚性细胞;b.第一次均等分裂为2个细胞;c. 2个子细胞分裂形成4个细胞原胚;
d.早期球形胚;e.具完整结构的早期体细胞胚
(引自 Fifueroa等,2002)

乎处于解体状态,其生理隔离更加明显,因而很容易与原组织分离。在悬浮培养中,到后期可见许多体细胞胚漂浮在液体培养基中(图 1.11e)。固体培养时,也可观察到体细胞胚从外植体或愈伤组织上脱落的现象。在有些体细胞胚发育中,还出现介于器官发生和体细胞胚发生的中间类型,早期发育类似于体细胞胚发育,但以后似乎胚胎发育异常,在胚芽的部位形成多个不定芽(Padmanabhan等,1998)。

由于大多数体细胞胚起源于单细胞,因此对于单个植株来讲,通过体细胞胚形成的再生植株,其遗传特性相对稳定。而器官发生途径再生的植株,其起源比较复杂。尽管近年来在许多植物上观察到,直接由外植体细胞再生的植株可以起源于单细胞,但经过愈伤组织的器官发生,在许多情况下起源于多细胞,所以实验中常常观察到器官发生途径的再生植株为嵌合体的现象。

从上述体细胞胚形成的过程可以看出,体细胞胚的发育过程与合子胚基本相同。但在形态结构和生理特性上与合子胚还是有一定区别。合子胚在发育初期具有明显的胚柄,而体细胞胚一般没有真正的胚柄,只有类似胚柄的结构。特别是那些发育初期类似于动物胚胎发育途径的体细胞胚,这一点更为明显。另外,合子胚的子叶是相当规范的,可以作为分类的依据,单子叶植物只有一片子叶,双子叶植物有两片子叶。而体细胞胚的子叶常不规范,有时具有两片以上的子叶。此外,与相同植物比较,体细胞胚的体积明显小于合子胚。在一些贮藏物质的含量上也存在较大差异。如体细胞胚的干物质含量如蛋白质、多糖等显著低于合子胚。此外,体细胞胚不能有明显的脱水干燥过程,因此,体细胞胚的含水量比合子胚要高得多(崔凯荣和戴若兰,2000)。与

合子胚相比，体细胞胚还有一个明显的特点就是没有休眠。合子胚在胚胎发育完全进入子叶期以后，经过一系列的物质积累和脱水就进入休眠，而体细胞胚则直接形成植株。在不同的培养条件和植株种类中，形成植株的胚胎时期有所不同，一般在心形期以后的各个阶段均可直接发育成小植株（Zimmerman, 1993）。

三、影响体细胞胚发生的因素

1. 外源激素对体细胞胚发生的调控

生长素对体细胞胚发生具有重要的调控作用。尽管 NAA 和 2,4－D 在离体培养中诱导体细胞胚形成均有报道，但现有研究显示，2,4－D 是应用最为广泛的生长素。以胡萝卜、三叶草以及苜蓿悬浮细胞系诱导体细胞胚产生的体系中，2,4－D 的应用有着规律性的变化。首先是在较高浓度下诱导胚性细胞的形成，然后在降低 2,4－D 的浓度下产生早期胚胎，一般在球形胚形成后，除去生长素则有利于体细胞胚的继续发育。崔凯荣等（1998）对枸杞体细胞胚发育的研究表明，胚性愈伤组织形成后，如不及时转入降低或去除 2,4－D 的培养基中，则胚性细胞就不能进入体细胞胚胎发育。在三叶草、芹菜的体细胞胚形成中也观察到，处于球形期的体细胞胚，如果不转入降低 2,4－D 浓度的培养基中，则球形胚继续产生分支的球形胚链，似乎被“锁定”在球形胚时期，而不能继续正常的胚胎发育进程（Nadel等，1990；Parrott, 1991）。

虽然生长素的使用浓度具有上述规律，但对于具体的使用浓度，不同植物之间具有较大差异。一般单子叶植物使用的浓度高于双子叶植物，造成这种差异的原因目前还不清楚。一般认为，不同植物之间培养初期的感受态细胞对生长素的敏感性可能不同（Padmanabhan等，2001）。也有人认为是某些植物吸收生长素后，容易在细胞内形成生长素－氨基酸的复合体形式，因而需要较高浓度的外源生长素（Ribnicky等，1996）。

外源生长素在体细胞胚形成中的调控机制目前并不十分清楚，但越来越多的研究显示，外源生长素并不能直接调控细胞的发育动态，而是通过一系列细胞内外的信号转导途径介导完成调控作用。当细胞感受生长素相关信号后，引起一系列生理生化的变化，如启动特异基因表达、合成特殊蛋白、调整内源生长素的极性运输等（Souter和 Lindsey, 2000）。现有研究证明，在球形胚期形成的生长素的极性运输，对体细胞胚的进一步发育尤为重要。如果球形胚阻断生长素的极性运输或改变生长素的极性运输方向，均会影响体细胞胚的正常发育。

细胞分裂素对体细胞胚发育的影响报道较少，但几乎所有的有关体细胞胚发生的培养基配方中，均有细胞分裂素的配合使用。不难理解，细胞分裂素在促进细胞分裂、维持细胞活跃生长中具有重要的生理功能。而要完成体细胞胚胎发育，细胞分裂是基本前提。当胚胎结构建立后，细胞分裂素对于维持茎和根分生组织的正常发育具有重要作用（Schmülling, 2002）。体细胞胚诱导发生中常用的细胞分裂素为 BA。根据不同植物类型，BA 也可与其它细胞分裂素配合使用。体细胞胚诱导培养中，细胞分裂素的使用浓度一般低于生长素的使用浓度。在有些植物中，细胞分裂素常常引起体细胞胚的异常发育。如在芹菜的培养中，使用玉米素常常在球形胚上发生不定芽，使胚胎发育不能正常进行（Choi等，1997）。

2. 培养基及培养条件对体细胞胚形成的影响

一些研究证明，培养基中的氮源亦会显著影响离体条件下的胚胎发生。据 Halperin 和 Wetherell的早期报道，体细胞胚的产生要求培养基中含有一定浓度的还原态氮。他们在野生胡

萝卜叶柄节段培养物中发现，只有当培养基含有低浓度的 NH_4Cl 时，才能形成体细胞胚。Halperin等进一步的研究表明，NH_4^+ 的作用关键在诱导培养阶段。如果在愈伤组织诱导阶段培养基中同时含有 KNO_3 和 NH_4Cl，那么，无论分化培养基中是否含有 NH_4Cl，愈伤组织都能形成胚。Vesco和 Guerra (2001) 进行的费约果植物体细胞胚诱导的试验也证明，培养基氮源影响体细胞胚的发生频率。在 NH_4^+ 和 NO_3^- (15:34) 的培养基中，每个外植体的体细胞胚可达 10个以上，而培养基只有 NH_4^+ 或 NO_3^- 时，体细胞胚发生频率很低。类似的结果在一些茄科植物的体细胞胚诱导中也观察到。近年的研究还证明，一些氨基酸可以代替还原态氮的作用，上述费约果植物的体细胞胚培养体系，在只含 NO_3^- 的培养基中，如果加入 4mmol/L的甘氨酸，可以显著提高体细胞胚的发生频率。

一些体细胞胚规模生产模式的试验还发现，球形胚形成后，如果降低培养基的无机盐浓度，可以显著促进体细胞胚的进一步发育。Lee等 (2001) 在改进胡萝卜体细胞胚生产程序的试验中，将胚性愈伤组织转入减少浓度的 MS培养基中诱导体细胞胚，结果显示，当胚性愈伤组织形成后，在只含 1/2 MS无机盐浓度的培养基中，体细胞胚的形成可以比在 MS培养基中高 3～4倍 (图 1.14a)。Choi等 (2002) 在西伯利亚人参 (*Eleutherococcus senticosus*) 培养中也证明，在体细胞胚培养后期，降低培养基无机盐浓度，可显著提高体细胞胚的产量 (图 1.14b)。在一些试验中还发现，体细胞胚发育后期降低蔗糖浓度，也有利于胚的继续发育和提高体细胞胚的成苗率。此外，还有一些试验表明，培养基中加入一定浓度的水解酪蛋白、活性炭等附加成分，或改善气体交换状况，亦有利于体细胞胚胎发生。

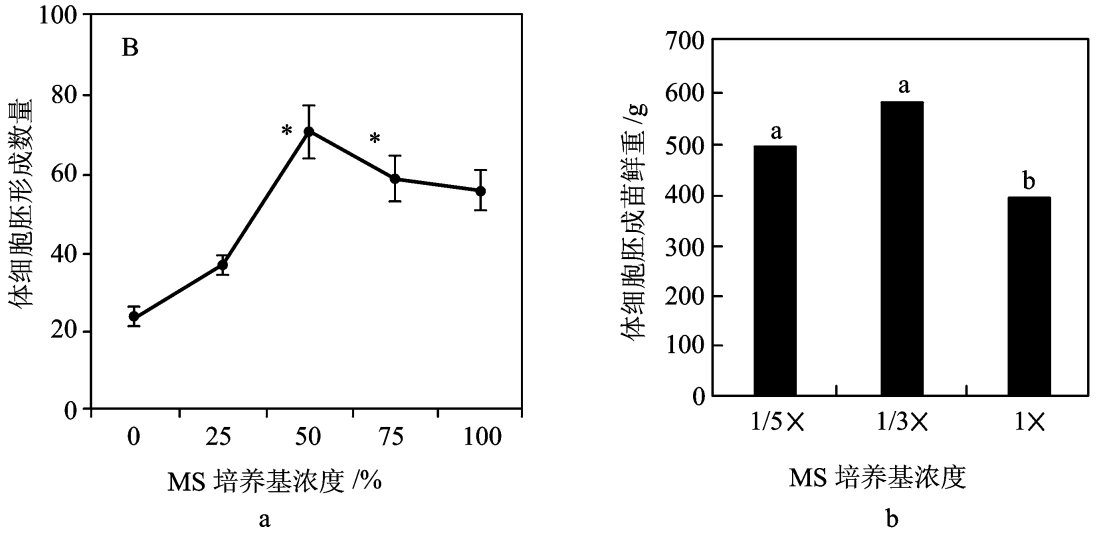


图 1.14 不同 MS无机盐浓度对体细胞胚发育的影响
a.胡萝卜体细胞胚形成数量；b.西伯利亚人参体细胞胚成苗产量
(a引自 Lee等，2001；b引自 Choi等，2002)

3. 不同基因型间体细胞胚形成能力的差异

体细胞胚的产生在不同类型的植物间具有明显差异。在已成功获得体细胞胚的植物中，以自然条件下容易产生无融合生殖胚的植物为多，且培养条件相对较为简单，如咖啡属植物、芸香科植物等。即使是同类植物的不同基因型，在体细胞胚诱导的难易、形成时间以及单个外植体产生体细胞胚的数量上也存在明显差异。马铃薯 18个不同基因型品种的体细胞胚形成能力的比较研究显示，以接种外植体与体细胞胚能否形成的资料统计，有 7个品种的体细胞胚发生率为

100%，而频率最低则只有 10%（图 1.15）。单个外植体产生体细胞胚的个数最高可达 160个，最低只有 2个。而且有趣的是，单个外植体产生体细胞胚数最多的品种，并不是上述体细胞胚诱导频率最高的品种（Seabrook和 Douglass，2001）。花生 16个不同基因型品种体细胞胚诱导研究也有类似的结果。对花生有性杂种系的研究认为，花生体细胞胚能否形成可能受 2对显性基因控制，而体细胞胚形成的数量又为另一个显性基因所增强（Parrott等，1991；Chengalrayan等，1998）。

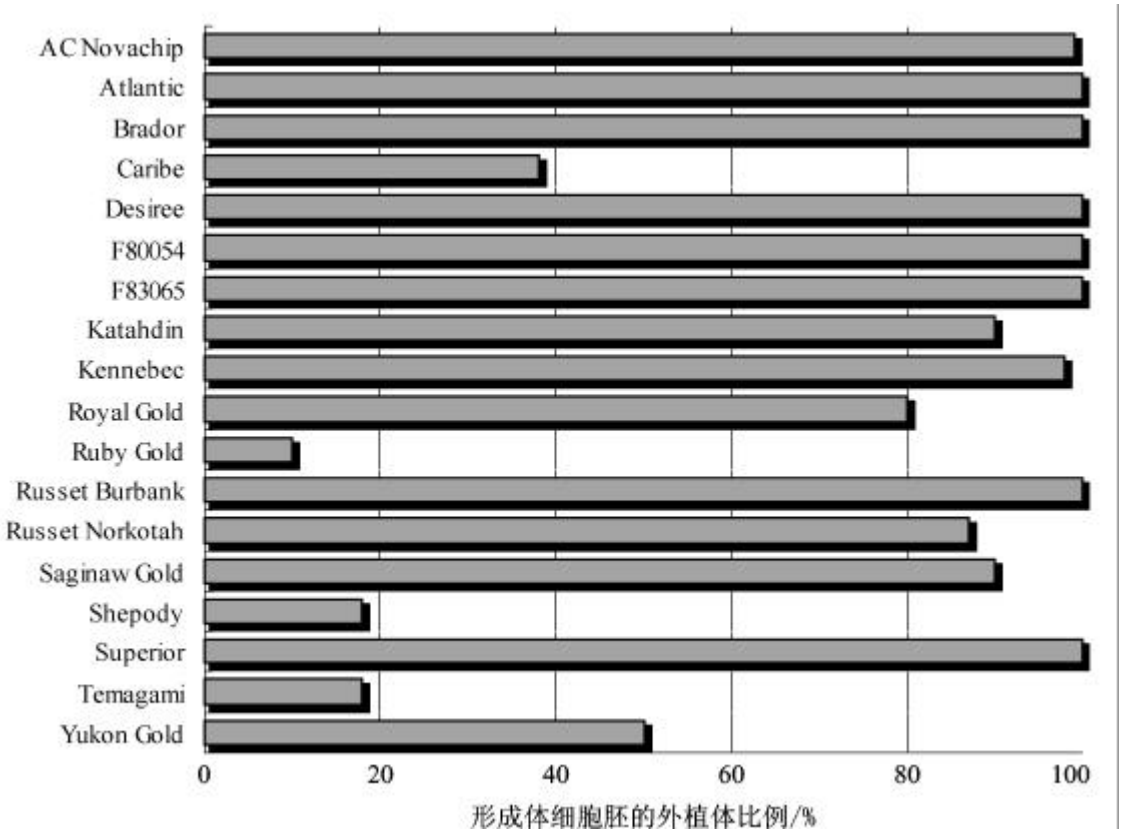


图 1.15　马铃薯不同基因型茎段外植体形成体细胞胚能力的比较
（引自 Seabrook和 Douglass，2001）

四、体细胞胚发生的生化与分子基础

1. 体细胞胚形成过程中内源生长素的变化

外源生长素对体细胞胚产生和发育的调控是通过调节内源激素的合成、代谢、极性运输和平衡而起作用的。Rabnicky等（1996）通过胡萝卜上胚轴培养实验证明，体细胞胚形成初期，细胞内具有较高浓度的游离态生长素。在他们的培养体系中，外源 2,4－D和 NAA比 IAA诱导体细胞胚效果好。分析显示，外源 IAA进入细胞后大多与氨基酸形成复合形式，而 2,4－D和 NAA在细胞内具有较高浓度的游离形式。他们认为，体细胞胚诱导初期，细胞内高浓度的游离生长素是必要条件。他们的研究还显示，体细胞胚发育中，内源 IAA的合成主要通过色氨酸途径，直接添加外源 IAA对其合成有反馈抑制，从而也影响体细胞胚的形成。而 2,4－D对 IAA的合成不存在反馈抑制，结果也提高了体细胞胚的发生频率。水稻胚性细胞的诱导也证明，高浓度的 2,4－D可诱导细胞内 IAA含量升高，当加入外源 IAA或阻止细胞内 IAA渗出而提高细胞内 IAA含量时，均可促进胚性愈伤组织形成（陈以峰等，1998）。香雪兰（*Freesia refracta* Klatt）花序外植体离

体培养显示,体细胞胚形成与外植体原形态学极性有关。处于花梗原形态学下端的组织能分化形成体细胞胚,而处于原形态学上端则不能形成体细胞胚。内源 IAA 分析显示,体细胞胚发生过程中,外植体内源 IAA 的分布发生了较大变化。发生体细胞胚的一端其内源 IAA 的含量明显高于另一端 (王丽等,1998)。这些试验说明,无论是细胞培养还是组织培养,体细胞胚在形成初期其细胞内源生长素的变化是至关重要的。

体细胞胚发生中,外源生长素的使用模式或者说规律,在大多数植物中是相似的,如诱导胚性细胞产生,或诱导愈伤组织转化为胚性愈伤组织,均需要高浓度的生长素。当球形胚形成后,则需要降低生长素水平才能完成体细胞胚的继续发育。以后的研究显示,生长素的这一应用规律与胚胎发育过程中内源激素的变化是一致的。Ribnichy等 (2002) 以胡萝卜合子胚发育为模式,详细研究了胚胎发育中内源 IAA 的变化规律 (表 1.3)。胡萝卜合子胚在发育过程中,内源 IAA 有一个规律性变化。在受精前,子房内源自由态 IAA 浓度相对较低,受精后则逐渐升高,到球形期和心形期达到高峰,比受精前高出 80 倍。以后又逐渐下降,在鱼雷期以后又回复到受精前的水平。胡萝卜体细胞胚发育中也观察到类似的变化,但内源 IAA 开始下降的时期比合子胚早,在球形胚后期内源 IAA 即开始下降,而高峰期出现在原胚向球形胚过渡的阶段 (Michalczuk 等,1992)。

表 1.3 胡萝卜胚发育过程中内源 IAA 的变化

发育时期	胚大小/μm	IAA 浓度 (ng/g FW)		
		自由态	结合态	总含量
受精前子房		15±4	2 257±424	2 272±413
受精前子房		28±5	1 962±563	1 990±483
受精后子房	75~125	608±69	4 986±595	5 594±582
受精后子房	75~125	504±52	1 063±482	1 567±463
球形胚晚期/心形胚早期	125~225	2 060±696	7 490±3 440	9 550±4 126
鱼雷形胚早期	400~500	24±5	824±386	848±392
鱼雷形胚晚期	900~1 100	27±4	796±292	823±289

(引自 Ribnichy 等,2002)

生长素不仅影响体细胞胚的早期发生,同时也影响体细胞胚的后期发育。生长素对体细胞胚后期发育的影响是通过极性运输实现的。有关生长素的极性运输对胚胎发育的影响已有许多研究。在合子胚的发育中,这种极性运输严重影响胚形态的建立。Liu 等 (1993) 利用拟南芥幼胚培养体系,揭示了生长素极性运输由球形胚期的轴向对称转向心形胚期的两侧对称的过程。如果这一过程受阻,则导致子叶异常发育成筒状子叶,而不是正常的 2 个子叶。在生长素极性运输突变体 pin1 中证实了上述结果。已克隆的 pin 同源基因研究显示,生长素的极性运输及其对胚胎发育的调控,是一系列胚胎发育相关基因有序表达的结果。

2. 体细胞胚发生过程中的特异蛋白质

体细胞胚的形成,从发育生物学的角度讲,与合子胚形成相同,也是相关基因有序表达的结果。而蛋白质作为基因表达的产物,通常可作为某些发育过程的标记。有关体细胞胚形成中蛋白质含量和组分的变化,尽管不同研究在绝对含量上不尽相同,但总体趋势均表现出,体细胞胚形成过程中水溶性蛋白明显增加。李中奎等 (1993) 比较水稻胚性与非胚性愈伤组织的蛋白质

含量变化的研究显示，两种愈伤组织蛋白质含量的差异，主要表现为胚性愈伤组织的水溶性和盐溶性蛋白高于非胚性愈伤组织，而醇溶性蛋白则低于非胚性愈伤组织（表 1.4）。进一步研究显示，体细胞胚发生期间产生一些特异蛋白质。Sung和 Okimoto (1983) 早期在胡萝卜体细胞胚和愈伤组织中分别分离到各自的特异蛋白：愈伤组织特异蛋白 C1和 C2以及体细胞胚特异蛋白 E1和 E2。随后在众多植物的体细胞胚形成中均检测到不同的特异蛋白。如苜蓿体细胞胚性细胞中有一特异的相对分子质量为 50×10^3 的膜相关蛋白，这一蛋白在非胚性细胞中检测不到。邢更生等 (1999) 在小麦、枸杞植物中分别检测到相对分子质量为 49×10^3 和 35×10^3 的体细胞胚发育早期特异蛋白。水稻胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织中也检测到两类不同的蛋白质组分，在胚性愈伤组织中检测到的是相对分子质量为 51×10^3 和 68×10^3 的蛋白，而非胚性愈伤组织中检测到的是相对分子质量为 45×10^3 和 54×10^3 的特异蛋白（仿继朝等，1994）。尽管这些特异蛋白在体细胞胚形成中的功能目前还没有更详细的研究，但至少它们可以作为标记蛋白，用于鉴定胚性愈伤组织或胚性细胞。

表 1.4　水稻不同愈伤组织（干重）可溶性蛋白质含量（μg/mg）

可溶性蛋白质	胚性愈伤组织	非胚性愈伤组织	继代 10次的愈伤组织
水溶性蛋白质	136.3	94.5	115.3
盐溶性蛋白质	30.0	17.6	24.5
醇溶性蛋白质	10.6	14.4	10.9
碱溶性蛋白质	13.2	14.4	13.6

（引自李中奎等，1993）

AGPs（阿拉伯半乳糖蛋白）是植物中广泛存在的糖蛋白，其蛋白质部分富含羟脯氨酸、丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸。大多数 AGPs存在有 Ala－Hyp重复序列或类似重复序列，暗示 AGPs可能作为调控蛋白调控某些基因的转录。在细胞中，AGPs主要分布在细胞壁和质膜上，利用一系列单克隆抗体已鉴定出一些与特殊发育相关和特殊组织相关的 AGPs，其中与单克隆抗体 JIM8结合的 AGPs在油菜中主要存在于性细胞和胚胎发育早期的胚柄中。在胡萝卜体细胞胚发育中，这种抗体检测的 AGPs存在于胚性细胞和早期体细胞胚中，在非胚性细胞中没有 AGPs。如果在一些非胚性悬浮细胞系中加入这类 AGPs，则可使其恢复胚胎发生能力。因此，有理由相信，AGPs在植物体细胞胚发生过程中起到了调控作用（Souter和 Lindsey, 2000）。

近年来的研究发现，某些病程相关蛋白可能也与体细胞胚的形成有关。van Hengel (1998) 在胡萝卜悬浮培养细胞衍生的原生质体培养诱导体细胞胚过程中，随着体细胞胚的形成，在培养基中检测到几丁质酶（chitinase）和 AGPs的积累。Dubois等 (1991) 在菊芋的体细胞胚诱导中发现，β－1,3－葡聚糖酶（β－1,3－glucanases）与愈伤葡聚糖降解有关，推测该酶可能与体细胞胚形成有关。后来的研究证明，有些病程相关蛋白可能同时也与植物的发育调控有关。Helleboid等 (2000) 在菊芋悬浮细胞培养中比较了胚性和非胚性细胞蛋白质组分的差异，结果显示，胚性细胞中 3种不同组分（相对分子质量为 38×10^3、32×10^3、25×10^3）的蛋白质显著高于非胚性细胞。进一步分析表明，这些组分的蛋白质主要是 β－1,3－葡聚糖酶、几丁质酶和渗透相似蛋白（osmotin－like protein）。

3. 体细胞胚形成的基因表达调控

体细胞胚发生的基因表达调控是一个相当复杂的过程，它不仅涉及到胚胎发育本身的相关基因的有序表达，同时还涉及到对培养条件作出反应的相关基因的表达，如激素调控基因和细胞分化基因等。目前，通过基因表达的差异显示和胚胎发育突变体等技术，已分离出几十个与体细胞胚发育相关的基因。除了一些典型的激素调控基因外，还有其它类型的基因。以胡萝卜体细胞胚培养为实验材料，鉴定分离的与体细胞胚发生和发育相关的基因列于表 1.5。除了胡萝卜体细胞胚系统分离的基因外，在苜蓿、烟草、拟南芥以及一些薯蓣类作物的体细胞发生体系中，也分离鉴定了一些相关基因，这些基因大多与胡萝卜体细胞胚相关基因相似。从已鉴定的基因表达时序分析，这些基因可分为 3类。一类是涉及到胚性细胞转变和体细胞胚早期形态建立的基因，如 ECP31、ECP40、EP2、EP3、DC9.1、EF1－a等，这类基因对体细胞胚的早期发育极为重要。一些突变体分析显示，当这些基因突变时，体细胞胚则不能正常形成 (De Jong等，1992)。另一类是体细胞胚的整个发生和发育过程中始终表达的基因，有的甚至持续到植株再生，如 Gea31。还有一类就是与体细胞胚发育过程有关的基因，如 DC8、DC59、DC3、EMB－1、DC2.1、DC7.1和 Gea41等。在此类基因中，不同基因在胚胎发育的不同时期其表达强度和表达顺序亦有差异，如 EMB－1、Gea41和 DC7.1只在球形胚至心形胚期间表达，而 DC8和 DC59只在心形胚期间表达。即使是在相同时期表达的基因，其表达强度亦有较大差异 (Liu等，1996)。大多数研究还显示，涉及体细胞胚发育程序的基因，在合子胚的同期发育中也有相同的表达模式。近年来，利用拟南芥胚胎发育突变体系统，已分离鉴定出许多与胚胎发育有关的基因，研究这些基因的表达模式和功能，对于体细胞胚发育过程的理解具有重要作用。

表 1.5 胡萝卜体细胞胚形成相关的部分基因

基 因	表达产物	表达时期	资料来源
DC8	LEA (Grp3)	心形胚	Borrkird 等，1986；Franz 等，1989；Hatzopoubs等，1990
DC59	Oleosin	心形胚	Choi等，1987；Hatzopoubs等，1990
DC3	LEA (Grp3)	原胚、球形胚、心形胚	Wilde等，1988
EMB－1	LEA (Grp1)	球形胚、心形胚	Ulrich等，1990；Wurtele等，1993
ECP31	LEA (Grp4)	原胚	Kiyosue等，1992，1993
ECP40	LEA (Grp2)	原胚	
EP2	Lipid transfer	原胚	De Vries等，1988；Sterk等，1991
EP3	Chintinase	原胚	De Jong等，1992
DC2.1	Pro－rich protein	球形胚、心形胚、鱼雷胚	Aleith和 Richter，1990
DC7.1	Gly－rich protein	球形胚、心形胚	
DC9.1	Gly－rich protein	胚性细胞、原胚	
EF1－a	Elongation factor	球形胚	Apuya和 Zimmerman，1992
CEM1	EF1－a	原胚、球形胚、心形胚、鱼雷胚	Kawahara等，1992
Gea14	Lipid transfer	胚性细胞、球形胚、心形胚	Liu等，1996
Gea 31	PR－protein	胚性细胞、球形胚、心形胚、鱼雷胚、小植株	
Gea41	Heat－shock	球形胚、心形胚	

体细胞胚发育过程中,除了涉及到上述直接表达产物的基因外,还具有多种其它基因调控形式,如转录因子、Nod因子以及 DNA甲基化等介导的基因表达与关闭 (崔凯荣和戴若兰,2000)。遗憾的是,目前对于这些调控途径的研究还只能通过一些间接手段观察相关因子在体细胞胚形成中的消长,对于其具体的调控机制还缺少直接的实验证据。

思考题

1. 细胞学说与细胞全能性的概念。
2. 细胞分化的阶段及细胞结构的变化。
3. 真核生物细胞周期调控的分子机理。
4. 为什么说 luxury gene是细胞功能分化的调控基因?
5. 离体条件下生长素与细胞分裂素在细胞分化中的作用。
6. 器官发生的影响因素及调控机理。
7. 体细胞胚与合子胚在形成途径和结构上的异同。
8. 影响体细胞胚形成的因素及其调控。
9. 根据体细胞胚形成的生化和分子基础,思考如何深入进行体细胞胚形成的理论与技术研究。

第二章

离体培养下的遗传与变异

细胞组织的离体培养属于无性繁殖范畴。从理论上来说,无论是细胞还是组织培养,再生的个体均承传了母体的遗传基础,这也是离体培养技术作为植物快速繁殖应用的基础。然而,众多的研究显示,离体培养的细胞、愈伤组织以及再生植株均普遍存在着变异。由于离体培养条件下并没有发生雌雄配子的受精,因此,Larkin和 Scowcroft(1981)提出把由任何形式的细胞培养所产生的植株统称为体细胞无性系(somaclones),而把这些植株所表现出来的变异称之为体细胞无性系变异(somaclonal variation)。研究离体培养条件下的这些遗传和变异规律,已成为现代遗传学的重要内容之一,由此而发展起来的遗传学分支——体细胞遗传学已越来越受到科学界的重视。

就对生物遗传的影响而言,细胞工程技术本身包含了双重性:遗传的稳定性和变异性。对于单纯的繁殖技术而言,离体培养的技术操作是细胞、组织或个体的不断复制。因而从理论上讲,这种操作只发生了数量和形式上的变化,如通过扩大繁殖增加了细胞、组织以及个体的数量,通过培养调节将细胞形式转变为组织、个体形式,或者将组织个体形式转变为细胞形式。然而,正是由于这些操作技术本身的特点,使离体培养这一无性繁殖形式具有了特殊性,因为起始培养的材料、培养基成分以及培养时间的不同,使其产生的无性后代的遗传稳定性也有了一定差异。这种差异既表现在不同的培养类型间,也表现在不同的植物间。但总体来说,这些变异是在培养过程中产生的,属于随机性变异。此外,细胞工程还有一类技术操作,其目的在于创造变异,如体细胞人工突变、基因转移和体细胞融合等。这些离体操作技术,在某种程度上具有一定的目的性和方向性,可以在短期内获得从自然界可能要经过几年乃至上百年的进化才能获得的性状,从而加速了生物进化的进程。本章主要针对培养过程中的随机变异以及体细胞人工诱变的应用作重点介绍。

第一节　离体培养中的遗传与变异特点

一、离体培养中的遗传稳定性

无论是细胞的增殖还是个体的再生,离体培养的细胞学基础是有丝分裂。有丝分裂的 DNA 半保留复制和染色体均等分裂机制,从理论上可以保证离体培养物在一般情况下的遗传稳定性。一些离体繁殖体系的遗传变异分析显示,在准确选择培养方式的前提下,离体繁殖可以具有较高的遗传稳定性(Phillip等,1994)。正是基于这一理论,利用离体培养技术建立了多种植物的无性繁殖体系。

离体培养的遗传稳定性表现的另一个方面是,即使发生某些变异,也无需采取连续自交的办

法分离纯合体,只需选择适当的培养方式进行离体繁殖,即可以淘汰变异、选择变异或分离纯合体。离体培养下的变异均属于无性变异,即使变异发生,从个体的角度讲只会发生在少数性状上。因此,很容易从群体中剔除变异个体,从而维持离体培养群体的遗传稳定性。如大多数无性繁殖植物的快速繁殖就是采用的这一技术途径,以保持所繁殖对象的品种典型性。相反,某些变异也可以通过离体培养选择保留并稳定下来,这也是离体培养遗传稳定性利用的途径之一。一些无性繁殖植物在自然界也有无性变异的情况,如多年生植物的芽变就是如此。如果某些变异是人类所需要保留的类型,即可通过离体繁殖分离保留,形成新的遗传稳定群体。此外,通过性细胞培养可以在短时间内获得经过杂交产生的不同基因型配子体(gametophye),通过染色体加倍即可迅速获得纯合系,而无需进行连续的自交。正是因为这些优势,离体培养技术已成为遗传与育种研究中获得稳定遗传群体或种质材料的重要辅助手段。

二、离体培养条件下遗传变异的特点

离体培养变异的普遍发生已被众多的研究所证实(表 2.1)。朱至清(1991)曾总结了水稻、小麦、玉米、马铃薯、甘蔗和烟草等十几种作物的离体培养变异发生情况,说明各种植物离体培养中变异发生的普遍性。研究显示,在体细胞变异中,就单个变异体来讲,离体培养中变异的性状往往是单一的,或者是少数几个性状的变异。Onmo(1981)分析水稻种子愈伤组织起源的植株变异显示,在来自 75个愈伤组织的 1 121个再生植株中,发生变异的植株与供体品种比较,只有 1个性状表现差异的占 72%,2个以上性状表现差异的只占 28%。然而就同一培养体系的再生群体而言,变异又具有多样性。我们在马铃薯原生质体培养中观察到,即使是植株形态的变异也是多方面的,包括株高、叶片形态与厚度、茎叶颜色等,这些性状在原生质体再生植株中表现出与供体品种差异明显的变异。Tremblay等(1999)对黑云杉(Picea mariana)65个系的 7 047个体细胞胚植株和白云杉(P. glauca)22个系的 3 995个体细胞胚植株的表型变异分析显示,尽管两个种的体细胞胚植株变异频率分别只有 1.0%和 1.6%,但分析发生变异的植株,其变异范围却较大,按形态变异即可分为 9类。仅在矮化型变异一个性状上,就表现出显著的矮化程度上的差异。生长 4~5年后,矮化植株的高度呈现一系列的变异类型,一些极度生长限制型的矮化植株株高只有几厘米,最矮类型的株高只有 2~3 cm,丛生型变异也表现出一系列不同程度的变化(图 2.1)。

表 2.1　部分植物离体培养再生植株的表型变异频率

植物种类	再生植株来源	变异频率/%
烟　草	体细胞愈伤组织	10
水　稻	胚愈伤组织	71.9
甘　蔗	幼叶愈伤组织	>18
玉　米	体细胞愈伤组织	14
蔓　青	花粉植株	12.7
大　麦	花粉植株	10~15
番　茄	幼叶愈伤组织	>5.8
马铃薯	叶肉原生质体	100
菠　萝	冠芽愈伤组织	7
	腋芽愈伤组织	34
	裔芽愈伤组织	98
	幼果愈伤组织	100

(引自李宝健和曾庆平,1990)

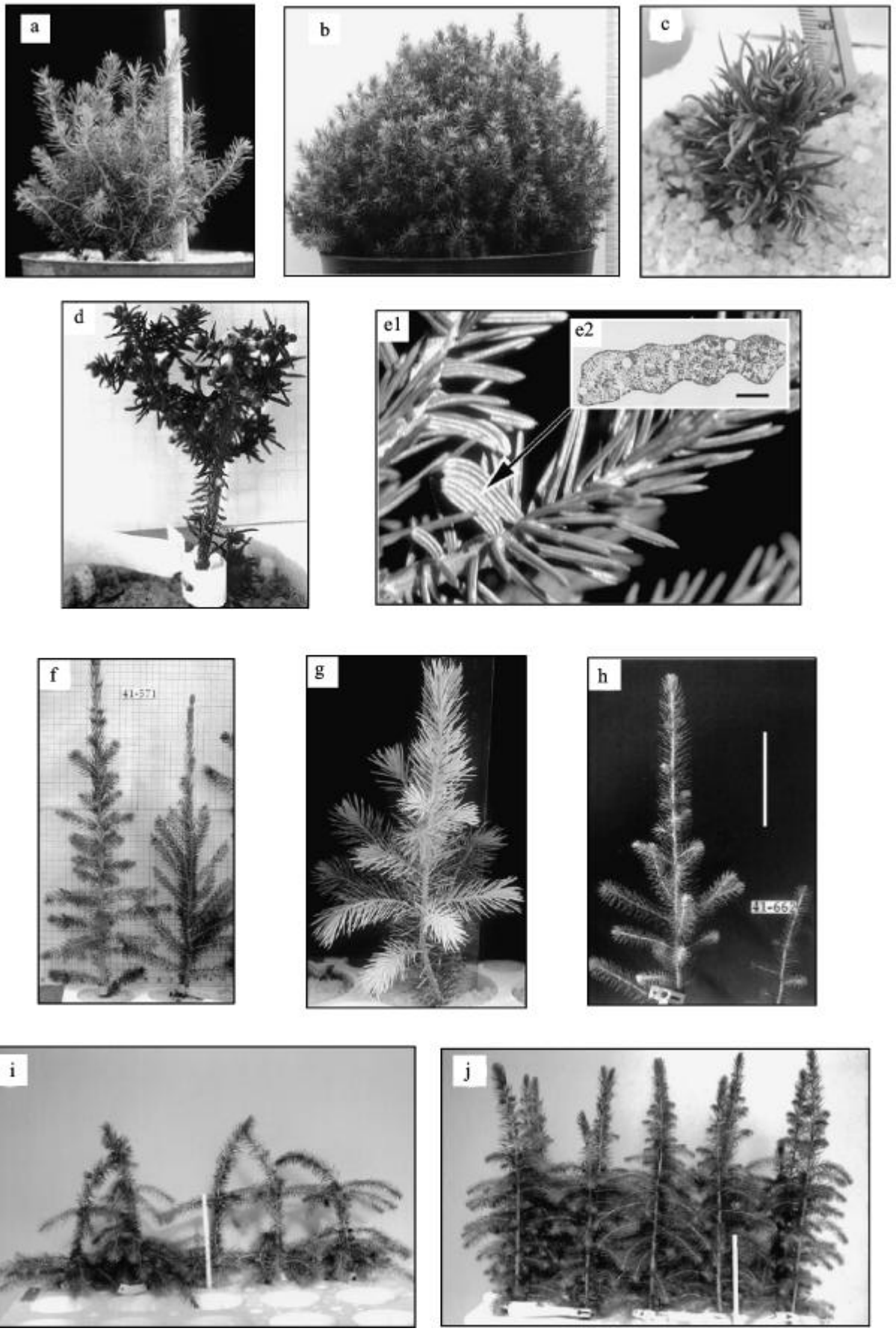


图 2.1 云杉体细胞胚植株变异类型

a 矮化变异,生长 5年株高为 8 cm;b. 丛生型变异,生长 4年株高为 50 cm;c 钩状茎变异型,6个月植株 2～3 cm,以后死亡;d 植株畸形变异,茎异常增粗,叶变短,成活率低;e1. 叶片易脆型变异,e2. 叶片组织结构异常;f 分支异常型变异;g 部分失绿型变异;h 单纯矮化型,所有性状正常,但株高只有供体植物的 1/4;i 株形斜生变异;j 对照植株

与有性重组相比,离体培养中的体细胞变异还具有另一个特点,即体细胞突变性状具有一定局限性。从表型上看,在不同植物类型中经常发生的体细胞变异主要是植株形态(株高、叶形和叶色等)、生长势、育性和某些抗性等性状的变异。从生理生化特性上看,容易出现同功酶谱、次生代谢的消长等变异。一些单基因控制的性状不仅发生隐性突变,也发生显性突变。Larkin和Scowcroft(1983)在142个小麦体细胞无性系中观察到10余种显性基因的突变。一些隐性突变必须经过无性系的自交才能表现出来。体细胞无性系变异在有性繁殖时,其遗传分离比例有时呈现出不规则的变异。

嵌合性是离体培养中变异的又一特点。嵌合性是指同一有机体中同时存在有遗传组成不同的细胞,它是组织培养中常见的现象。实际上,愈伤组织在大多数情况下是一种具有不同染色体数和不同遗传变异程度的细胞所组成的嵌合体,这些细胞各自进行不同步的分裂。Blaschke等对毛曼陀罗(*Datura innoxia*)的愈伤组织悬浮细胞染色体倍性分析和细胞分裂周期的观察显示,愈伤组织细胞具有多种染色体水平,不同倍性的细胞分裂周期各不相同,倍性愈低的细胞有丝分裂周期愈短,倍性高的则周期长。不仅愈伤组织具有嵌合性,而且在其再生的植株中亦广泛存在。如硬粒小麦中胚轴节段培养再生的植株中,其茎尖、根尖细胞染色体检查均表现出嵌合性(表2.2)。组成嵌合体的细胞除整倍体外,还有非整倍体(张冬生,1989)。我们在马铃薯花药培养和原生质体培养再生的植株中均发现这种嵌合体。

表2.2　*Triticum durum* 6个无性系植株体细胞染色体数

序号	2n<14	2n=14	2n=15～27	2n=28	2n=29～55	2n=56	2n>58
1	1(7)	7	37(16～24, 26)	76	8(29, 39, 40)	4	2
2	—	3	5(17, 20, 23)	11	1(33)	—	1
3	5(9, 11, 12)	6	21(15,18,21～27)	33	3	—	—
4	3(7)	1	4(16, 21, 22, 27)	22	3	—	—
5	1(11)	6	5(15, 22, 26)	14	1(32)	—	—
6	2(12)	1	18(18, 20～26)	21	1(40)	—	2

注　括号外为个体数,括号内为染色体数。

(引自张冬生,1989)

培养条件下的体细胞变异除了可遗传变异外,还有非遗传变异,其中一种称为外遗传变异(epigenetic variation)。外遗传变异不涉及基因结构的变化,而只是在基因表达水平上的变异,它是细胞内原有遗传潜力在离体培养中诱导表达的结果,如最常见的生长素自养型变异等。Gautheret早在1946年就发现,在正常情况下,鸦属植物的组织必须有外加生长素才能在离体条件下生长。但在偶然情况下,有的组织经过几次继代培养之后,获得了一种没有外源生长素也能够生长的能力,即生长素自养能力。以后在烟草、苜蓿及百日草等多种植物的细胞培养中均发现了生长素自养型变异。这种基因调控水平上的变异不能通过有性世代传递给后代植株,但在离体培养中却可以经过培养继代,长期保存下来,只要不经过有性过程,这些性状一般不会丢失。如我们在马铃薯试管薯诱导中经常发现,当一个新的品种开始诱导试管薯形成时,其诱导条件十分严格,但反复继代后,则可以自发地产生试管薯,或对诱导条件要求降低,这种特性在离体培养中可以长期维持。

非遗传变异的另一种情况是生理适应性 (physiological adaptation) 变异。这种生理适应性变异与后遗传变异不同,它们通常是在某种外界条件存在时才表现出变异。当这种外界条件不存在时,变异也随之消失。最典型的生理适应性变异是培养基中硝酸盐的存在所引起的培养物硝酸还原酶活性增强,而硝酸盐不存在时,硝酸还原酶活性又恢复到正常水平。

三、影响体细胞遗传与变异的因素

植物在离体培养条件下,由于脱离了母体组织,因而外植体本身必须发生一系列的生理生化变化才能适应离体环境。另一方面,作为离体培养的环境条件,特别是培养基,也必须符合外植体生长的需要。由此可见,影响离体培养细胞遗传变异的因子必然包括外植体本身及其培养条件。

1. 供体植物

供体植物的遗传背景对体细胞变异具有直接影响。Sacristan (1971) 的研究指出,供体植株原有的倍性水平在培养细胞多倍化过程中起着重要作用。他比较了长期培养的还阳参单倍体细胞系和二倍体细胞系发生的细胞学变化,结果发现,单倍体组织的二倍化现象比二倍体组织的四倍化现象更为常见,这表明在培养中处于二倍体水平上的细胞比处于单倍体水平上的细胞较为稳定。

Tremblay等 (1999) 比较研究黑云杉和白云杉体细胞变异时也观察到,体细胞变异与供体植物的遗传基础有关。在 1万多个植株的形态变异分析中,尽管总变异频率在 2个种之间没有显著差异,但种内不同基因型间的变异率却差异显著。黑云杉中体细胞变异频率最大的基因型可达 57.6%,而有些基因型变异率则为 0。白云杉种内不同基因型的体细胞变异也与之相似,变异率最高的基因型可达 42.6%,而有些基因型则根本不发生变异。朱至清 (1991) 在两个小麦花粉培养系中也发现这种情况,编号为 13−7的株系很容易发生变异,而编号为 45−1的株系则十分稳定,因此认为,不同基因型对外界诱导因素的敏感程度的差异造成了变异的不同。刁现民等 (2002) 以我国 7个谷子 (Setaria italica) 品种的幼穗为外植体,比较了来自幼穗愈伤组织再生植株的有性世代 R_2 的变异频率,发现体细胞无性系变异在 7个品种间具有显著差异,体细胞变异系的大多数表现在有性世代出现性状分离现象,只有少数在有性世代中表现稳定 (表 2.3)。

表 2.3 谷子体细胞无性系 R_2 的变异频率

基因型	R_2 株系数	未变异株系		变异株系				总变异 /%
		株系数	百分率 /%	稳定变异	百分率 /%	分离变异	百分率 /%	
豫谷 1号	210	201	95.7	0	0	9	4.3	4.3
豫谷 5号	120	104	86.7	5	4.2	11	9.1	13.3
高 39	170	152	89.4	3	8	15	8.8	10.6
郑 407	121	110	90.9	3	2.5	8	6.6	9.1
冀谷 14号	55	39	70.9	4	7.3	12	21.8	29.1
C445	70	47	67.1	0	0	23	32.9	32.9
矮宁黄	100	83	83.0	6	6.0	11	11.0	17.0

(引自刁现民等,2002)

供体植物对体细胞变异的影响还体现在组织细胞的生理状态上。不同组织细胞由于存在发育时期和生理功能的差异,因而在细胞的理化水平以及细胞所处的后遗传状态均有较大差异。组织学研究显示,成熟的分化组织细胞在染色体组成上也有很大变异。

顶端分生组织中,由于 DNA合成之后立即进行正常的细胞分裂,故分生组织的细胞均保持在二倍体水平上,以分生组织为外植体的再生植株通常可以维持供体植物的典型性,体细胞变异频率很低。

然而,在分化组织中,由于细胞分化过程中的核内有丝分裂或核内复制,其结果是在活体内组织分化期间就会出现体细胞多倍性。在植物体内,这些多倍性细胞在正常情况下不再发生分裂,以维持正常分化细胞的功能。然而,在离体培养条件下,培养基中的激素以及培养环境有可能刺激这些多倍性细胞分裂,进而分化形成多倍体植株。

Nagl (1981) 采用细胞分光光度计分析比较了不同起源细胞的愈伤组织倍性,由茎尖细胞分裂活跃的组织所诱导的愈伤组织,其细胞中 DNA含量稳定,染色体数也相应稳定。而起源于细胞体积较大、具有液泡的薄壁细胞的愈伤组织,则细胞 DNA含量为 1C或 2C～12C等不同水平,染色体数也表现出相应的不稳定性。日本的 Wakasa (1979) 曾对菠萝不同外植体来源的再生植株的体细胞变异进行过详细研究,冠芽、裔芽和幼果 3种不同外植体类型的再生植株的变异率存在显著差异,冠芽再生植株变异率为 24%,裔芽再生植株变异率为 98%,而幼果再生植株的变异率达 100%。在多年生植物培养中,供体树的年龄与体细胞变异也有一定关系,变异频率有随树龄的增加而增高的趋势。

2. 培养基及培养方式

离体培养再生植株的过程是一系列培养因子和环境的调控过程,这些培养条件对于体细胞变异产生着不同程度的影响。普遍认为,培养方式、激素以及其它附加成分均会诱导体细胞变异的发生,因为离体培养本身可能就是一种变异诱导的过程。尽管如此,有关培养基成分以及培养条件对体细胞变异影响的研究却并不多。

培养基激素浓度和不同激素配比对再生植株的染色体倍性有一定影响。不同的激素浓度可以有选择地诱导不同倍性的细胞的分裂。在豌豆根段培养物和细胞培养中均发现,低浓度 2,4－D (0.25mg/L) 能增加多倍体细胞的有丝分裂,减少二倍体细胞的有丝分裂,而高浓度 (20mg/L) 则能促进二倍体细胞的分裂。与 2,4－D相似,较高浓度的 NAA也能有选择地促进二倍体细胞分裂。Bennici (1971) 观察到,在添加 0.02mg/L激动素和 1mg/L NAA的培养基上建立起来的纤细单冠菊幼苗愈伤组织,保存 80d以后,其中多数细胞为二倍体,少数为四倍体。将这些愈伤组织转移到含不同激素水平的培养基上,发现其多倍体细胞的分裂频率不同。0.02mg/L激动素和 4mg/L NAA的多倍体分裂频率为 20%,而 0.02mg/L激动素和 1mg/L NAA时的多倍体分裂频率为 100%。出现这一现象的原因可能是多倍体细胞通常具有较强的环境忍耐能力,能够通过一些自体调节使细胞分裂。这一结论在一些激素浓度不足的培养体系中也被证明,由于激素不足而引起的培养失败,幸存下来的细胞往往是染色体加倍的细胞。Brossard (1976) 在烟草细胞培养中发现,高浓度的激动素和低浓度的生长素均可诱导多倍体发生。李亮亮等 (1998) 在掌叶半夏 (*Pinellia Pedatisecta Schott*) 的培养中也获得类似结果。在他们近期的研究中显示,2,4－D在一定程度上增加了非整倍体的变异频率,而 BA则在一定程度上增加了多倍体的发生,但在培养基中添加一定浓度的 $AgNO_3$ 则可以使这种变异降低。

激素除了引起染色体倍性的增加外,在一些培养中还发现染色体倍性减少的现象。首次报道培养过程中的染色体减数是在 1948年 (Huskins, 1948),以后一些研究者在他们的工作中也相继发现这一现象,但有关体细胞倍性减数的资料还十分有限。顾蔚 (1999) 在蚕豆组织培养中发现,体细胞染色体减数与使用极端的激素浓度有关。在他的试验中,不含激素的培养基其多倍体发生频率为 6.31%,在 10 mg/L NAA 和 2.5 mg/L KT的培养基中,单倍体发生频率可达 13.03%。

除了培养基的外源激素可以引起变异外,培养基的物理状态以及培养类型也会引起细胞的变异。一般来讲,悬浮培养的细胞较半固体培养的细胞易产生变异。不同培养类型引起的体细胞变异可以有很大差异。通常而言,原生质体培养的体细胞变异大于细胞培养的变异,而细胞培养的变异又大于组织器官培养的变异。在细胞培养中,性细胞培养再生植株的变异要大于体细胞培养的植株。马铃薯原生质体培养再生植株的变异达到 100%,而茎尖培养再生植株基本没有变异。在因培养类型不同所引起的变异中,不仅有染色体倍性的变异,同时还有基因突变,染色体结构变异,以及非 DNA水平引起的变异等。

3. 继代培养的次数

由继代次数引起的体细胞变异几乎在各种类型的植物中均有报道。一般来讲,继代时间越长,继代次数越多,细胞变异的概率就越高。Sinden和 Shepard在 1983年报道烟草继代培养 5年的愈伤组织,其再生植株与供体基因型相比,几乎没有形态正常的植株。染色体分析显示,这些植株大多为非整倍体或多倍体。从刚诱导的玉米愈伤组织中分化的植株,在形态上与供体基因型基本一致,但培养 3年后愈伤组织的再生能力显著下降,再生植株生长异常,细胞学分析显示出染色体断裂和带型变异。掌状半夏愈伤组织继代培养显示,在培养初期的 1~3个月内,愈伤组织的染色体变异频率显著低于培养时间超过 12个月以上的愈伤组织 (表 2.4)。Patnaik等 (1997) 在马丁香草 (Cymbopogon martinii) 的悬浮细胞再生植株体细胞倍性变异中观察到,他们所建立的有些可持续继代培养的细胞系,在连续 40周的继代后,其再生植株能力仍没有明显下降,但自然加倍的频率随培养时间的延长而明显增加。在他们的试验中,同一细胞系培养 4周的再生能力与培养 8周的再生能力相当,但继代培养超过一年的细胞系,其再生植株大约有 10%~20%为加倍的四倍体和八倍体。

表 2.4 培养时间对掌叶半夏愈伤组织染色体变异的影响

培养时间/月	观察细胞数	亚二倍体		二倍体		多倍体和非整倍体	
		细胞数	百分率/%	细胞数	百分率/%	细胞数	百分率/%
1	92	14	15.2	65	70.7	9	9.8
3	51	6	11.8	39	76.5	6	11.8
12	50	15	30.0	27	54.0	7	14.0
18	83	29	34.9	33	39.8	19	22.9

(引自李亮亮等, 1998)

第二节　体细胞变异的细胞遗传学基础

离体培养的体细胞变异，从本质上来说是细胞对环境压力的应答机制的调整。实现这一机制调整的始发点是放弃自然条件下的细胞学控制程序，重建新的细胞学控制程序，这种程序重建的结果导致了染色体数量和结构的改变（Phillips等，1994）。染色体整倍性和非整倍性变异的现象几乎存在于所有的培养类型中，由于染色体计数的实验技术简单、方便，因此也是离体培养中细胞学鉴定最常用的方法。然而，产生这些染色体变异的细胞遗传学机制却十分复杂。体细胞染色体变异的产生包括不正常有丝分裂、染色体重排等多种非正常的细胞学现象。

一、DNA在核内重复复制

在正常情况下，植物细胞的染色体数和DNA含量是恒定的。体细胞的染色体数为2n，DNA含量为2C，经过减数分裂形成的配子其染色体数和DNA含量均为体细胞的一半，分别为n和1C。植物细胞在离体培养条件下，经常出现不正常的有丝分裂，如DNA在核内重复复制（endoreduplication）但不发生细胞分裂，其结果是染色体组数增加，形成同源多倍体。如果这种DNA重复复制多次发生，细胞内DNA含量就会不断上升。Bennici等（1978）在硬粒小麦（Triticum durum）的中胚轴培养试验中发现，中胚轴形成的愈伤组织因培养时间的延长而增加了细胞中的DNA值。原始中胚轴外植体细胞88.3%的DNA值为2C～4C，11.7%的外植体DNA值小于8C。培养5 d以后，DNA含量在细胞间发生了变化，13 d后检查，4.8%的外植体细胞的DNA值小于2C，79.5%的DNA值为2C～4C，6.6%的DNA值小于8C，9.1%的DNA值为8C或8C以上（表2.5）。DNA的核内再复制在有些情况下可以反复进行。据D'Amato等（1980）报道，红花菜豆（Phaseolus coecineu，2n＝22）幼胚离体培养形成的愈伤组织，正常二倍体细胞只占1/2，由于DNA在核内多次复制，有的细胞核内DNA值达到128C。Sabn和Earle（1998）在鸭茅状磨擦禾（Tripsacum dactybides）的非成熟胚培养中观察到，存活的再生植株均为二倍体和四倍体，加倍后的植株在形态和发育方面均很正常。对于一些中间类型的倍数性的形成，有研究认为可能是由于DNA经过重复复制后，在以后的复制中出现非同步复制所致。如第一次DNA复制没有发生分裂的4n核，在此后的分裂进程中，与正常分裂的2n核发生融合，从而形成六倍体（张冬生，1989）。

表2.5　硬粒小麦中胚轴培养中DNA值的变化

培养天数	不同DNA值细胞比例/%			
	<2C	2C～4C	<8C	8C或>8C
0	—	88.3	11.7	—
5	—	80.7	16.8	2.5
13	4.8	79.5	6.6	9.1
17	9.7	81.5	7.9	0.9

（引自张冬生，1989）

近年研究显示,DNA核内重复复制的发生与细胞分裂周期的调控有关。在正常情况下,只要细胞从 G_1 期进入 S期,DNA复制发生,细胞随即进入 G_2 期到 M期,完成细胞分裂。但在离体条件下,一些进入 S期的细胞,在完成 DNA复制后不进入下一阶段就完成分裂,从而使细胞内 DNA值和染色体倍性增加一倍。这种细胞进入间期后又开始 DNA合成,如果分裂能正常进行,则由此而产生的细胞即为四倍体。如果分裂仍然不能进行,则 DNA值和染色体倍性就会再增加一倍,从而使细胞内的 DNA值和染色体倍性成 2^n 形式增加。

这种 DNA核内重复复制在植物发育过程中的一些特殊组织器官中也是经常发生的。有人认为这一现象可能是个体发育中细胞高度分化所必需的。玉米胚乳和子叶发育研究显示,DNA重复复制可能与 M期的不同 CDK活性有关,而此时的 CDK活性又受到磷酸化和去磷酸化的影响。同时,在玉米中还发现了 CDK的抑制子 CKI,DNA核内复制通过 CDK的调控在动物发育和病理细胞中已被证实。因此,Larkins等 (2001)认为,这一机制可能是 DNA核内重复复制的重要调控途径。拟南芥髓组织、成熟叶片以及托叶细胞多倍体发生过程的研究显示,一个在 G_2 期表达的 CDK基因 CKS1At参与调节了 DNA重复复制过程 (Jacqmard等,1999)。此外,Cebolla等 (1999)在他们的研究中发现,一个与细胞周期蛋白降解有关的基因 ccs52也与 DNA重复复制和多倍体细胞产生有关。现有资料显示,DNA的核内重复复制可能涉及到一些细胞周期调控基因的开启与关闭。

二、染色体断裂与重组

染色体结构变异是体细胞变异的另一重要类型。染色体断裂与重组是离体培养中染色体结构变异的主要原因之一,也是体细胞变异中经常发生的现象。染色体结构变异的细胞学特征是,分裂中期出现断裂的染色体片段、落后染色体以及染色体桥,其结果是在体细胞中出现染色体易位、缺失、倒位等多种类型的结构变异。染色体结构变异现象在许多植物的愈伤组织中均有报道,如早期 Lillian等 (1964)观察到,烟草继代培养 8年的细胞系有染色体桥、断片和落后染色体等现象。以后在多种植物如西藏长叶松 (Pinus roxburhii)、柳杉 (cryptomeria japonica)的愈伤组织细胞中也观察到染色体桥和落后染色体。因缺失和易位引起的染色体异形在燕麦和玉米体细胞中均有发现,一些因染色体断裂引起的重接和染色体重排在大蒜、牧草、大麦等植物的培养细胞、再生植株以及再生植株的有性后代中也有报道。Binsfeld等 (2000)在向日葵非对称融合杂种植株的有性世代中观察到大量的染色体非整倍体情况,观察细胞分裂中期的染色体行为时,检测到大量染色体桥和落后染色体 (图 2.2)。

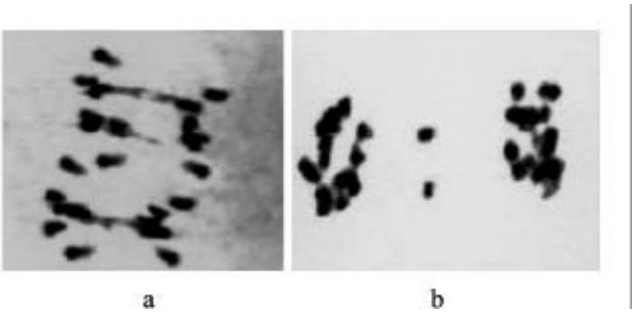


图 2.2 向日葵不对称体细胞杂种后代细胞分裂中染色体非正常行为
a 染色体桥;b. 落后染色体
(引自 Binsfeld等,2000)

染色体断裂与 DNA甲基化程度有关。增加 DNA甲基化,可能引起染色体断裂。甲基化程度的增加可能抑制 DNA的复制效率,使得 DNA复制不能同步,从而造成后期桥的产生和染色体的断裂 (Phillips,1994)。染色体结构变异既可发生在愈伤组织细胞中,也可发生在再生植株中,有时在一些再生植株的有性后代中也能观察到染色体结构的变异现象。产生染色体结构变异的

再生植株一般生长不正常,生活力低下,很难长期生存。因此,以保存种质资源为目的的离体培养,应尽可能避免这种变异发生,以免造成基因资源流失。

三、非正常有丝分裂

离体培养中,染色体除了整倍性变异外,还可观察到大量的非整倍性变异,这种愈伤组织往往分化能力低下,再生植株大多生长不正常,有性繁殖的遗传稳定性差。纺锤体形成异常使得有丝分裂不正常是其原因之一。

在正常的细胞有丝分裂过程中,位置相对而立的两极纺锤体的形成,使复制了的核内染色体均等地分离到两个子细胞中。在一个分裂细胞中如果出现三极或多极纺锤体时,必然导致染色体的不均等分离,使其子细胞中染色体数出现差异。单冠毛菊(*Haplopappus*)植物的体细胞只有四个染色体($2n=4$),因而常被用来进行组织培养条件下的细胞学行为观察。据 Sunderland (1973) 报道,单冠毛菊的组织培养物经常可以观察到三极纺锤体的形成,因此在细胞分裂时染色体不是均等地分配到两个子细胞中,从而使形成的子细胞染色体数出现差异。伴随三极或多极纺锤体的形成,常常可以观察到落后染色体,细胞分裂时,落后染色体留在一个子细胞中,因此,也造成两个子细胞染色体数的不均等,从而产生非整倍体和亚倍体。

据 Sunderland (1980) 报道,核裂经常导致双核与多核细胞的出现。在红花菜豆的胚培养愈伤组织中,双核细胞有 70% 有核裂现象,蚕豆子叶诱导的愈伤组织细胞的双核和多核细胞出现的频率也相当高。在核裂出现频率高的材料中,多倍体、亚多倍体和非整倍体细胞的出现频率亦相应增加。由此说明,通过不正常的核直接分裂,亦是单倍体、多倍体和非整倍体形成的途径之一。

第三节　体细胞变异的分子遗传学基础

体细胞变异除了发生在染色体水平上,更多的是在基因水平上的变异。如果从利用体细胞变异的角度看,染色体变异大多是一些畸形变异,真正可利用的染色体变异是十分有限的。与此相反,基因水平上的变异在表型上大多只是个别性状的改变,不会影响再生植株的正常生长发育,因此,从再生植株的这些变异中就有可能筛选出有益的变异。基因水平上的变异从根本上讲就是 DNA水平上的碱基突变或修饰状态的改变。随着分子生物学技术的不断发展,体细胞变异的分子遗传机理研究也在多种植物中相继开展,为我们从分子机理上了解体细胞变异、控制和利用体细胞变异奠定了基础。

一、碱基突变

碱基突变是指 DNA 序列中碱基的改变。如果改变碱基的 DNA 序列处于结构基因的位置或调控序列的位置,就可能导致遗传状态的改变。碱基突变是产生体细胞变异的重要途径之一。

对于单基因控制的遗传性状,大多数碱基突变可以稳定遗传,而且符合孟德尔遗传分离规律,这一点已在水稻、烟草和玉米的体细胞变异中得以证实(张春义和杨汉民,1994)。Brettell等 (1986) 从 645株玉米杂种胚培养的再生植株中,发现了一个稳定突变体 Adh1 乙醇脱氢酶突变

体),突变体可以产生有活性的酶,在电泳时较原来酶的迁移速度慢,遗传上表现为单基因控制。对变异基因克隆并进行序列分析发现,该基因第七外显子中一个编码谷氨酸的 GAG中的 A转换为 T,使翻译肽链中的谷氨酸转变为缬氨酸,从而减少了一个负电荷,导致电泳迁移速度变慢。此后,Dennis等 (1987)又从 218个胚外植体愈伤组织再生的 1 382个植株中,分离了一个酶缺失突变体 Adh1-s,研究发现该突变体也是碱基变化引起的,其变异发生在第 106个氨基酸上,其 AAG三联体密码突变成了 TAG (UAG)终止密码,使其多肽不能完整合成。在拟南芥、烟草等植物的离体培养再生植株中,也发现一些单基因性状的碱基突变。

二、DNA序列的选择性扩增与丢失

在植物基因组研究中,即使是在自然条件下,不同生长环境和不同发育阶段均可能发生 DNA成分和基因组体积的变化。早期的研究认为,DNA值的改变与倍性变异是一致的。但近年来的研究显示,DNA值的变化是一个比较复杂的分子生物学现象。当 DNA的 C值以整倍性形式增加或减少时,其变化与染色体倍性的变异是一致的。然而,有些 DNA值的变化却与倍性没有直接联系,研究发现,这种变化多半是由于 DNA序列的选择性扩增或部分序列丢失所致。早在 20世纪 80年代 Larkin和 Scowcroft就提出,DNA序列的扩增与丢失也是体细胞无性系变异的原因之一。其中研究较多的是 DNA序列扩增的变异。离体培养下 DNA序列的选择性扩增包括两种情况,一是重复序列的扩增,二是基因的选择性扩增。

在许多植物中均观察到,DNA分子中一些重复序列在培养条件下发生了扩增。Lapitan等 (1988)以生物素标记的 480 bp重复序列 DNA片段为探针,发现小黑麦杂种再生植株当代 7R染色体短臂端粒位置上的这种重复序列发生了扩增,而且这种扩增可以遗传至少 3代。在水稻、小麦等作物中也发现一些微卫星 DNA的扩增。水稻悬浮培养细胞的 DNA分析发现,未分化的培养细胞中一些高度重复序列的扩增比供体材料高 75倍,而不同品种的叶片这种扩增差异只有 2~3倍。亚麻卫星 DNA和小麦 rDNA研究中也发现类似现象。

基因的选择性扩增在植物个体发育中经常发生。离体培养下的基因选择性扩增被认为是细胞在短期内为满足某种需要而产生足够的基因产物的一种调控手段 (张春义和杨汉民,1994)。抗除草剂草甘磷的突变系就是一个典型的例子。草甘磷能抑制 EPSPs (3-烯醇丙酮酸莽草酸盐-5-磷酸合成酶)活性,抗草甘磷突变体则具有较高 EPSPs活性。DNA分析显示,这种突变体的 EPSPs活性的提高是因为参与编码该酶的基因选择性扩增,增加了 mRNA水平,从而增加了酶的含量。Peter等 (1990)的研究显示,在烟草抗草甘磷的突变体中,至少有 2个与 EPSPs合成相关的基因发生了选择性扩增,而且这些突变体在没有草甘磷选择压力存在的情况下仍富含 EPSPsmRNA。在矮牵牛、胡萝卜等植物的抗草甘磷突变体中,同样检测到 EPSPs基因的选择性扩增。磺酰脲类 (Su)除草剂抗性突变,也是因为相关酶基因的选择性扩增的结果。烟草广谱抗性突变体 Su27的 Southern印迹分析显示,Su27突变系中的乙酰羟基合成酶基因扩增了约 20倍。在其它一些突变类型如氨基酸耐性、热忍耐性等突变体中,也观察到相关基因的选择性扩增。尽管这种基因扩增引起的变异在多种植物中发现,但这些变异是否能有性传递,目前还缺少进一步的实验证据。

在许多植物种类中还观察到,在组织培养过程中,以及经组织培养再生的植株,甚至在这些植株的后代中,有时也会发生 DNA序列丢失的现象。DNA序列丢失多发生在 rDNA及其间隔序

列，某些重复序列 DNA区域也易发生丢失。Landsmann (1985) 利用 DNA随机克隆，首先在马铃薯中发现了再生植株有 DNA片段的丢失。随后 Cullis和 Clary (1986) 采用类似的方法，在亚麻再生植株中观察到 rDNA的减少。以后在大麦、小麦以及水稻的培养再生植株中，均检测到 rDNA的减少。DNA的减少不仅发生在核 DNA中，也有发生在叶绿体基因组中。一些 DNA序列的减少只发生在愈伤组织形成阶段，植株再生过程中又恢复到正常状态，目前还不清楚这种变化的生物学意义。

三、转座子活化

转座子（transposon）首先是由 McClintock在玉米中发现的，现已证实它是引起许多遗传不稳定现象的重要原因。20世纪 80年代，Larkin和 Scowcroft首先提出，转座因子的活化可能是体细胞无性系变异的原因之一。因为组织培养中由于细胞快速分裂，异染色质复制滞后，引起细胞分裂后期形成染色体桥和染色体断裂。在断裂部位的 DNA修复过程中，位于异染色质区的转座子被激活继而转座，引起一系列的结构基因活化、沉默以及位置变化，造成无性系变异。我国学者朱至清 (1991) 认为，也可能是转座子在培养环境中首先被激活而转座，从而造成染色体的结构变异。

无论离体培养中转座子转座与染色体变异的过程如何，离体培养中转座子引起的体细胞变异是存在的。Peschke等 (1987) 以玉米 Ac转座子测验系为母本，与 1 200个由未成熟胚再生的植株进行测交，根据种子糊粉层颜色色素的变化，确定再生植株中是否携带有活化的 Ac转座子，结果在 56株中检测出 Ac活化。苜蓿组织培养再生植株中也观察到因转座子活化所引起的花色变异。最近，利用 Ds转座子系统进行异源转化，在一些作物中成功观察到转座子插入的体细胞突变，从而证明转座因子确实诱导了体细胞变异。Mckenzie等 (2002) 为了建立一个稳定的转座子标签体系，将 Ds－Ac转座系统导入球茎甘蓝中，获得的携带有转座系统的转化植株，在离体培养下增加选择压力，筛选稳定的转座子插入突变。结果观察到，在获得的 42个 Ac切除的稳定 Ds插入再生植株中，有 29个植株发生了 Ds再转座。足迹分析显示，在 Ds Donor－site序列附近发生了大量的缺失和重组。利用类似的策略，van Endkevort等 (1999) 在马铃薯中也成功获得转座子异源插入突变。用转座子解释体细胞变异有许多合理性，如变异频率高、沉默基因活化等。因此，有关转座子在体细胞无性系变异中的作用，也是将来体细胞遗传变异研究的热点。

四、DNA甲基化

DNA甲基化（methylation）在基因表达调控中具有重要作用。自然条件下，生物体不仅能通过 DNA甲基化和去甲基化来调控基因的表达与关闭，以控制生物的发育过程，同时也可以通过 DNA甲基化途径，来适应环境对生物体的压力 (Bird, 2002)。目前甲基化研究主要利用 HpaII和 MspI两种甲基化敏感的限制性核酸内切酶进行比较分析。HpaII和 MspI的酶切位点均为 CCGG，当靠外的 C被甲基化时，只能被 HpaII酶切，当靠内的 C被甲基化时，只能被 MspI酶切。在一般情况下，与 G相邻的 C更容易被甲基化。利用两种酶切片段的差异即可分析 DNA甲基化的变化。

离体培养再生植株的甲基化变化首先在玉米体细胞无性系再生植株中发现。来自玉米幼胚再生植株的某些无性系与供体相比发生了超甲基化，而另一些再生植株却只在与 G相邻的 C上

发生甲基化,而且这种甲基化在基因组中的分布是不均匀的。胡萝卜、番茄和马铃薯等多种植物的培养细胞或再生植株中,均报道发现了因 DNA 甲基化改变而产生的体细胞变异 (匀现民和孙敬三,1994)。 ovařk等 (1997) 在烟草细胞悬浮系“TBY-2”培养中,观察到由于渗透压的改变,细胞 DNA 出现了超甲基化的现象。他们在培养基中加入 NaCl或者甘露醇提高培养基渗透压,然后提取细胞 DNA检测 DNA甲基化变化情况。结果发现,在烟草基因组的 2个异染色质区 (HRS60和 GRS),其 CCG三核苷酸重复区和 CCGG四核苷酸重复区的 C几乎全部被甲基化。当把细胞转移培养到渗透压正常的培养基中时,DNA甲基化程度又可恢复正常。

除了 DNA甲基化程度的增加外,离体培养中的某些变异还来自于 DNA甲基化程度的降低。最典型的例子是油棕体细胞胚植株的雄蕊雌性化变异。 Rival等 (1997) 发现在大田间生长的油棕体细胞胚植株中,大约有 5%的植株花器不正常,表现出雄蕊雌性化和完全不育。产生这种变异的愈伤组织有两种类型,一种是 NCC (瘤状愈伤组织),另一种是 FGC (快速生长愈伤组织)。有意思的是,这两种愈伤组织的再生植株在雄蕊雌性化变异程度上具有一定差异。来自 NCC的变异植株,在种植 9年后,所有植株均可恢复正常。而来自 FGC的变异植株只有 50%能恢复正常。进一步分析显示,变异植株与供体植株的染色体倍性和 DNA值完全一致,通过检测 8 900个 RAPD (随机扩增多态性 DNA)标记的多态性,也没有发现分子水平上的变异。而 DNA甲基化程度分析显示,来自 NCC的变异植株,C的甲基化率比正常植株减少了 0.5% ~2.5%。而来自 FGC的变异植株,C的甲基化率比正常植株减少了 4.5% (Jaligot等,2000)。这些研究进一步说明,离体培养引起 DNA甲基化的变化,确实是体细胞变异的原因之一,因为有些甲基化类型在后代中可以表现出后遗传记忆 (epigenetic memory)。

近年来,通过不同的分子标记检测,已在许多植物离体培养的愈伤组织和再生植株中检测到广泛的变异,这些标记包括 RAPD、AFLP (扩增片段尺度多态性)和 SSR (简单重复序列)等,一些标记的多态性还与表型有一定联系。但到目前为止,对于许多标记的多态性研究还仅限于标记的检测。

第四节 体细胞无性系变异的诱导与选择

体细胞变异可以发生在培养的不同阶段,如愈伤组织阶段、器官发生阶段等。因此,体细胞变异可以在愈伤组织水平上表现,也可以在植株再生过程中出现变异。但是,一些愈伤组织发生变异后可能难以再生植株,因而有些变异不可能在形态发生中表现。所以,一般情况下,愈伤组织的变异比再生植株的变异频率更高。此外,体细胞变异还表现在再生植株的有性繁殖后代中。有些变异可能要通过有性世代才能表现或稳定,这也是体细胞无性系变异育种选择的基本过程。为了避免与杂交后代和突变后代在表述上相混淆,目前对于体细胞无性系变异的表示方法主要有两种,一种是 Chaleff (1981) 提出的以 R_0、R_1、R_2、…分别代表体细胞无性系变异的当代和自交以后的世代;另一种是由 Larkin和 Scowcroft (1983) 提出的以 SC_1、RC_2、RC_3…来分别代表体细胞无性系变异的当代和自交以后的世代。现在,这两种表述方式在体细胞无性系变异研究中均有应用。

离体条件下的体细胞无性系变异的筛选有以下一些明显的优点:a 由于筛选可以在离体条

件下进行,从而可以在小空间内对大量个体进行选择。b 细胞突变体的筛选可以在几个细胞周期内完成,且不受季节限制,因此筛选效率高。c 因为试验是在人工设计的培养条件下进行的,因此诱变和筛选条件可以根据需要进行调节和控制,从而提高了试验的重复性。d 由于变异是在单细胞水平上进行的,因此,一个突变体就是来自一个细胞,不会有非突变细胞的干扰,避免了整体植株水平上无性变异常呈现出的嵌合体,因而可以省去变异分离的麻烦。e 在细胞培养系统中,理化诱变剂可较均匀地接触细胞,因此可以引起培养细胞相对较高频率地发生突变,增加了选择机会。

一、体细胞无性系变异诱导材料的选择

以增加体细胞变异为目的的离体培养材料的恰当与否,往往对选择突变系具有至关重要的意义。选择起始材料需根据试验目标确定,一般需考虑以下几方面的问题。其一,目标性状的可行性。体细胞突变的频率虽然较高,但对于某一个体来讲,变异的性状是个别的,因此选择综合性状良好的植物品种材料,通过诱变改变个别不良性状,是体细胞突变系选择的目的。其二,必须充分考虑试验植物的细胞培养技术水平,只有对起始材料有良好的培养技术,才有可能制定完满的诱变及选择方案。如果起始细胞的培养技术不成熟,不能再生整株,则不能进行后续的各项操作。其三,适当的细胞类型亦是提高体细胞突变系筛选效率的重要条件。虽然各种状态下的培养细胞均可以作为分离突变细胞的来源,但实践中原生质体和悬浮细胞系常常被首先考虑作为起始材料。由于原生质体可以实现真正意义上的单细胞突变,因而它是体细胞变异的首选起始材料。但原生质体的培养技术具有一定难度,选择时必须充分考虑该植物的原生质体培养技术的成熟程度。活跃生长的细胞悬浮系具有较大比例的单细胞或呈小细胞团,且培养技术简单、易操作,是较为理想的起始材料。植物单倍体性细胞、特别是二倍体植物的性细胞作为诱变材料,因为等位基因位点的干扰小、诱变概率大,且获得突变体后容易通过人工加倍纯合稳定,使某些隐性变异更容易利用,也是较理想的起始细胞。目前已有许多关于花粉小孢子培养自发突变和人工诱变育种的报道(张晓伟等,2001;陆瑞菊等,2002)。

二、离体培养细胞的自发变异

离体培养的植物细胞会出现较高频率的自发变异,在烟草、甘蔗、还阳参、单毛菊和胡萝卜等多种植物的培养细胞及再生植株中,均观察到表型变异以及染色体数目的变异。表 3.1反映的即是部分植物离体培养再生植株的变异频率。可以看出,离体培养再生植株的自发变异比自然条件下的变异要高得多。体细胞无性系自发变异频率既与培养物的遗传背景、外植体类型及培养类型有关,同时也受培养时间、培养基成分等因素的影响。一般来讲,长期营养繁殖的植物、培养时间较长或继代次数较多的离体培养物等,均容易出现较高的变异率。另外,培养类型中,原生质体、细胞和愈伤组织培养等所出现的变异频率要高于组织或器官培养的变异。

离体培养中体细胞自发突变所产生的变异往往比较稳定,没有人工诱变的后续干扰,有利于分离和选择。如果采用花粉细胞培养获得自发突变,经加倍后还可迅速得到纯合的突变体。育种家们应用自发突变的这些优点,已选育出一些新品种,如美国 RNA植物技术公司已从番茄体细胞无性系变异中选育出新品种,台湾的育种家也从甘蔗体细胞无性系再生植株变异中选育出新品种。

三、离体培养细胞的诱变

诱变育种在 20世纪中叶曾作为重要的育种技术在各种作物中广泛开展。但由于个体水平上的诱变频率较低,一般需要在大量的个体中筛选少数的有效变异,这不仅工作量大,而且操作困难。同时,由于个体水平上的诱变常常出现嵌合体,后代分离时间长。因此,个体水平的诱变育种成效甚微。随着离体培养技术的不断成熟,在细胞水平上诱导变异,进而筛选有利突变体的技术途径,重新被应用到育种程序中。在细胞水平上诱导变异不仅比个体水平的诱导效率高,同时,由于细胞对于诱变条件的敏感性强,有时可以通过试验设计,将诱变与筛选同时进行,从而提高了诱变的目的性。离体培养细胞的诱变包括物理诱变、化学诱变以及理化诱变与压力选择相结合等方法。近年来,转座子插入也成为体细胞突变诱导中一种新的诱变策略。

1. 物理诱变

物理诱变主要是通过射线、磁场以及温度等对培养物进行一定处理,然后对处理后的培养物进行培养筛选。常用的射线处理包括 X射线、γ射线、快中子和紫外线等。

选择辐射类型应根据培养类型进行。如果以组织器官为诱导材料,可以选择辐射强度较大的 γ射线、快中子等进行辐射。如果是细胞或原生质体,则可以选择 X射线、紫外线等。特别是以原生质体为诱导材料时,可以使用紫外线照射,因为常用紫外线的波长为 270 nm,与 DNA吸收波长 260 nm相近,而原生质体因为没有细胞壁的屏障,对紫外线的敏感性较强,从而可以达到较好的诱变效果。加之紫外线辐射无需特殊设备,无菌环境容易控制,对于一些原生质体培养体系成熟的植物来说,是一种经济有效的诱变方法。何亚文等 (1998) 以 4个马铃薯栽培品种和 4个马铃薯野生种为材料,研究了紫外线辐射对原生质体影响。试验以紫外灯管 (15 W) 为辐射源,研究了用于马铃薯原生质体诱变的适宜辐射时间。结果显示,刚分离的原生质体对紫外线具有良好的敏感性,随着培养时间的延长,细胞在细胞壁形成后对辐射的敏感性显著降低。马铃薯原生质体对于紫外线的忍耐性与倍性有关,以原生质体失活为基准,在他们的试验中,六倍体材料辐射时间为 8 min,四倍体材料为 5.5 min,二倍体材料只有 2.5 min。这一特性与辐射对生物的染色体损伤是一致的,因为辐射通常会造成染色体断裂损伤,而倍性越高,造成同一部位染色体损伤的概率也越小,从而使其可以忍耐较强的辐射。在自然界,高海拔地区的植物其自然产生的多倍体比例显著高于低海拔地区,也是同样道理。

2. 化学诱变

化学诱变是通过在培养基中添加一些化学物质,细胞对这些化学物质吸收后直接或间接引起碱基突变。常用的化学诱变剂主要有:烷化剂,如硫酸二乙酯 (DES)、乙基磺酸乙酯 (EES)、甲基黄酸乙酯 (EMS)、环氧乙烷 (EO) 和乙烯亚胺 (EI) 等。此类诱变剂有一个或多个活化烷基,可与 DNA分子中的碱基或磷酸基结合,改变 DNA的结构而引起突变。碱基类似物 (5-溴尿嘧啶是胸腺嘧啶类似物,2-氨基嘌呤是腺嘌呤类似物等)。在细胞内核酸复制时,这些类似物可以掺入到新合成的 DNA分子中引起错配。移码诱变剂,如 ICR化合物和吖啶类似物等。此外,亚硝酸、羟胺等某些抗菌素亦可引起突变产生。化学诱变剂既是诱变因子,也是选择因子。因为正常细胞在加入上述诱变剂后一般不能正常生长,如果能在含有这些诱变剂的培养基中正常生长,多半属于发生突变的类型。

为了提高诱变效率和选择效率,采用化学诱变的方法一般是先将被诱变细胞培养在含有较

高浓度的诱变剂中,经过一定时间的诱变处理后,再转入降低诱变剂浓度的筛选培养基中对变异进行筛选。当然,经过诱变处理后也可以转入正常培养基中诱导成苗,以后根据目标性状再进行选择。化学诱变通常产生碱基突变,在诱变剂使用得当的情况下,可较高频率地筛选到突变体。特别是随着 DNA分子结构特性研究的不断深入,采用碱基类似物和移码诱变剂,将有可能实现定点诱变。

3. 复合因子诱变

诱变处理可以是单因子处理,亦可以是复合因子诱变。一般来说,复合诱变的效果比单因子诱变好。复合诱变处理的方法有:两种或两种以上的诱变剂同时使用或交替使用,同一种诱变剂连续重复使用等。实际应用中,应根据诱变剂的作用特点、培养细胞类型等情况确定具体的诱变方案。在诱变处理中,诱变剂量的确定是诱变效果的另一个关键。一般确定诱变剂量的原则是处理后培养细胞 50%能够成活的剂量,即半致死剂量。确定半致死剂量需经过试验,根据培养材料的类型、状态,诱变剂的种类、使用浓度,诱变的环境条件等因素而定。需要说明的是,所有诱变剂,无论是物理诱变剂还是化学诱变剂,均是对人体有害的。因此,在进行诱变处理操作时,必须采取严格的安全防护措施。

4. 转座子插入诱变

转座子插入诱变是近年来利用分子生物学技术发展起来的新的体细胞变异诱导方法。转座子既可直接将外源基因带入细胞内获得新性状,又可以独立插入通过其转座功能诱导变异。目前,使用较多的转座子体系主要是玉米的 Ac-Ds系统,其主要操作过程是,首先采用基因转化的方法将 Ac-Ds导入受体细胞,再通过体细胞培养或再生植株的自交或测交使 Ac因子切除,由于转座子插入的随机性,即可在切除 Ac的植株中筛选出不同变异。利用这一途径已在苜蓿、马铃薯、番茄、甘蓝等多种植物上获得可利用的体细胞变异植株。Mckenzie等 (2002) 在他们的研究中证实,同一试验获得的不同球茎甘蓝的变异株系,经分子标记检测具有丰富的多态性,说明转座子在转入异源植物中具有多个不同的插入位点,从而产生不同的表现型。此外,在动物、微生物诱变中发展起来的基因 knock-out技术,近年来也开始用于植物体细胞突变体的诱导。与转座子相比,基因 knock-out技术更具目标性。

四、体细胞无性系突变体的筛选

尽管离体培养细胞诱变的频率相对较高,然而真正能够利用的目的变异却很少。因此,利用有效技术进行突变体的分离和筛选,是获得目的变异的必需途径。突变体筛选的方法主要是根据拟分离的突变性状特性来决定和设计的。根据筛选时所采用的策略,筛选方法可分为两类:直接筛选法和间接筛选法。

1. 直接筛选法

直接筛选法能在设计的选择条件下,使培养细胞或再生个体获得直接感官上的差异,因此能将突变个体和非突变个体分离。最直接的做法是用一种含有特定物质的选择培养基,在此培养基上只有突变细胞能够生长,而非突变细胞不能生长,从而直接筛选出突变体。如抗除草剂、抗盐碱突变体的筛选,均可直接在培养基中加入一定浓度的除草剂或增加渗透压的物质。目前采用这一途径,已从多种植物中筛选出可利用的体细胞变异体。贾敬芬等 (2003) 以小麦幼胚愈伤组织为材料,在含有 1.4% NaCl的 N6培养基上直接筛选出小麦耐盐系。分析显示,耐盐系游离

氨基酸含量是供体亲本的 4.1倍,并在蛋白质含量和蛋白质类型上与供体亲本有明显差异。抗盐碱田间试验证明,该耐盐系在含盐量 0.3%的土壤中亩产达到 537 kg。郑企成等 (1993)也曾将小麦“京花 1号”花药经 γ射线处理后,再经 0.5% NaCl培养基直接筛选获得耐盐再生株系。李爱贤等 (2002)以甘薯“栗子香”为材料诱导胚性细胞系,在含有 2.0% NaCl的培养基中进行筛选,从 900个通过 γ射线辐射的细胞团中,获得了 22个抗盐愈伤组织,并得到 20个抗盐再生植株。Moon等 (1997)将玉米愈伤组织培养在含有 Al^{3+} 的培养基上,直接筛选出耐铝的突变体 Cat-100-6。经过 4代自交,突变系仍有较好的忍耐铝的能力,与供体近交后代的耐铝能力表现为中间类型 (图 2.3)。事实上,通过直接选择法已在不同植物中获得包括耐盐、抗除草剂等多种类型的体细胞突变体。

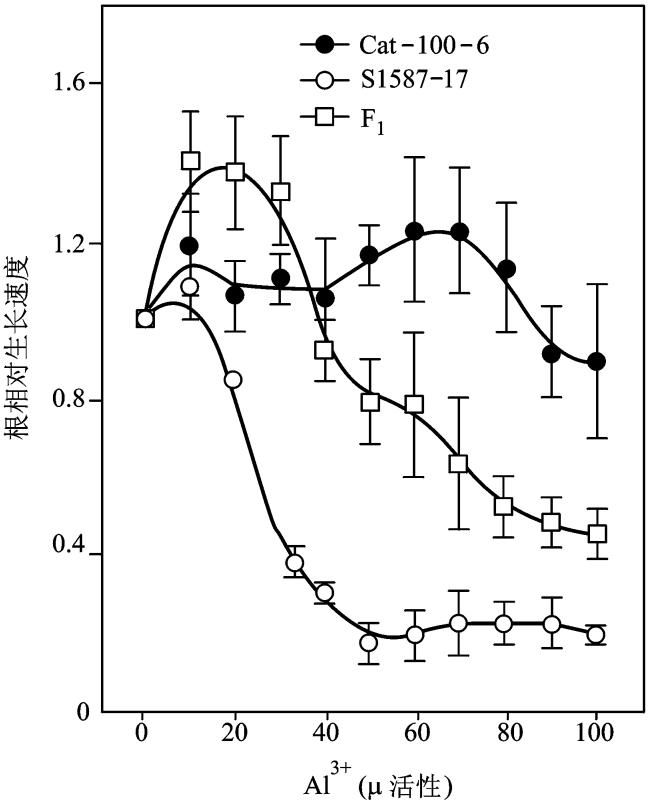


图 2.3 铝浓度增加对玉米耐铝突变系 (Cat-100-6)、铝敏感突变系 (S1587-17)和 F_1 (Cat-100-6×S1587-17)植株根相对生长速度的影响
每基因型 10株,水培于铝活性梯度为 0~93×10^{-6} 营养液中。根相对生长速度为水培 7 d的观测值 (引自 Moon等, 1997)

2. 间接筛选法

间接筛选法是一种借助于与突变表现型有关的性状作为选择指标的筛选方法。当缺乏直接选择表型指标或直接选择条件对细胞生长不利时,可考虑采用间接筛选法。如脯氨酸 (Pro)作为一种渗透调节物质,在维持细胞膜稳定性、细胞水分平衡等方面具有重要的生物学意义。植物在非生物胁迫如干旱、低温等条件下,体内 Pro常常有不同程度的升高,而且耐干旱和耐寒植物的体内 Pro往往较高。外源添加 Pro可以作为抗非生物胁迫的选择因素,能忍耐超常量的脯氨酸的细胞即可能为突变系。Dorffling等 (1997)以 Pro类似物羟脯氨酸 (HYP)为选择剂,获得了耐 HYP的体细胞变异系,其抗寒性比供体亲本增强,且能稳定遗传。林定波等 (1999)将锦橙株心细胞愈伤组织的悬浮细胞经 γ射线照射,然后在高浓度 Pro培养基中培养筛选,获得了抗寒体细胞变异愈伤组织,并再生植株。鉴定显示,抗寒愈伤组织及其再生植株的抗寒性分别比供体提高 1.4℃和 2.4℃,突变系体内的 Pro含量比供体增加了 1倍。

抗病突变体的筛选也常常用间接筛选的策略。由于在离体培养中直接接种病原物会严重阻碍细胞生长,因此可以在培养基中加入一定剂量的病原物类毒素来增加选择压力。赤霉病是小麦最严重的真菌性病害之一,同时由赤霉菌产生的赤霉菌毒素 (DON)不仅影响小麦正常生长,还可残留在籽粒中,严重时可造成人畜中毒。陆维忠等 (2003)以小麦幼穗为外植体诱导愈伤组织,然后将愈伤组织转入添加 DON的培养基中,经过两次连续诱导筛选,获得了抗 DON的愈伤组织。再将抗 DON的愈伤组织转入分化培养基再生植株,获得的再生植株经过连续田间抗病性鉴定筛选,已培养出抗赤霉病小麦新品种“宁 962390”。

五、体细胞无性系变异的利用

离体培养中体细胞自发或诱导变异,不仅试验操作方便,变异频率高,而且可能获得一些有性杂交短期内难以出现的变异。突变体除了可以直接为育种程序利用外,近年来,体细胞突变体还在许多基础研究中得以广泛应用。

1. 创造育种中间材料或直接筛选新品种

总体说来,体细胞群体涉及性状较多,但发生在同一突变体中的变异往往是单一或少数性状的变异。因此,体细胞突变技术特别适用于对一些综合性状良好,但个别性状需要改造的品种改良中。这既避免了有性杂交育种周期长的弱点,又没有转基因引起的安全性顾虑,使其在品种遗传改良中具有独特的优势和特点。据统计,诱导突变已被用来改良诸如小麦、水稻、大麦、棉花、花生和菜豆这些种子繁殖的重要作物。在全世界 50多个国家中,已培育出 1 000多个由直接突变获得的或由这些突变体杂交而衍生的品种。这些品种的主要特性包括品质改良、增强抗病性和抗逆性等。

品质性状改良是体细胞变异应用较为普遍的一个方面。在各国现有通过体细胞诱变选育的谷类作物品种中,品质得到不同程度改良的占 34.3%。其中,最著名的如意大利选育的硬粒小麦品种 Creso,其品质好、产量高、适应性强,成为该国小麦种植主栽品种。另一著名品种是通过射线处理选育的面包小麦 Sharbati Sc06ra,该品种的蛋白质含量由原品种的 13%提高到 16%,赖氨酸含量从 2.26%提高到 2.96%。在水稻方面,国外至少育成了 12个米质优良的品种,如日本的美雪锦、宾系酒 18号、加贺光、富士光和宵锦等,美国的 Calmochi201,法国选育的 Delta以其良好的籽粒品质推广应用到该国水稻总面积的 20%。此外,还有丹麦的无花青素原大麦 Galant,其商业应用价值在于能保持啤酒的稳定性,减少化学药品的使用等,从而创造了显著的经济效益。

抗病性是保证作物高产、稳产的重要性状。不少研究者以特殊的化学药剂和某种病原菌致毒素为选择剂,筛选出了许多抗病突变体。如用与烟草野火病 (Psudomonas tabaci)毒素化学结构相似的磺氧化亚胺甲硫氨酸 (MSO)作为选择剂,从经过 EMS诱变处理的烟草单倍体原生质体中筛选出了抗烟草野火病的突变体。Gengenbach和 Green以玉米小斑病的致病毒素为选择剂,对未经诱变处理的玉米愈伤组织进行抗性筛选,选出了抗小斑病毒素的愈伤组织并再生植株。此外,还有学者采用类似的方法获得马铃薯抗晚疫病、油菜抗黑胫病的细胞系。在甘蔗中,筛选出的抗鞘枯病、毛霉病的细胞系不仅再生出植株,而且用于大田生产。据不完全统计,诱变品种中大约有 1/4是抗病品种,其中 80%左右为抗真菌病害的品种。抗病突变体是诱变选育中最重要的突变体之一,它包括主要农作物抗真菌病害、细菌病害、病毒和类病毒等的各种突变体,如水稻抗稻瘟病、白叶枯病和稻胡麻叶斑病等的突变体,小麦抗锈病、白粉病、根腐病和耐赤霉病的突变体,大麦抗白粉病、病毒病和纹枯病的突变体,玉米抗大小斑病和青枯病的突变体,高粱抗丝黑穗病的突变体,谷子抗白发病的突变体,大豆抗灰斑病和病毒病的突变体,菜豆抗黄斑病毒病的突变体,马铃薯抗黑斑病的突变体,白菜抗霜霉病的突变体,油菜抗花叶病的突变体等 (孙光祖,1995)。这些突变体更多的被用作育种资源,对丰富植物的抗性资源起到了重要作用。

世界上大面积的盐渍土需要耐盐的作物品种,通过高盐胁迫筛选体细胞变异系被认为是培育耐盐品种的有效途径。目前已在包括烟草、辣椒、番茄、大豆和甘蔗等植物上获得耐高盐浓度的细胞系,有的已获得再生耐盐植株。由于离体培养可以直接提供适当的高盐碱培养环境,这一

途径已成为植物耐盐性突变体诱导筛选的主要途径。我国小麦、北方牧草和果树的耐盐体细胞突变体筛选已获得大量中间材料。但许多耐盐突变系属于生理适应性变异,当将其转入非高盐培养基以后,耐盐性会消失。有的耐盐突变系虽然很稳定,但再生植株十分困难。

以除草剂为选择剂筛选抗除草剂突变体的研究也是一个活跃的研究领域。Zenk首先从单倍体烟草细胞悬浮培养物中筛选出抗 2,4-D的细胞系,以后 Chaleff等 (1981)又从烟草二倍体细胞悬浮培养物中筛选出 7个抗性系,并从中获得了 4个再生植株与种子。此外,还在大豆、油菜等重要作物中筛选出抗除草剂的细胞系,有的已用于大田生产。

干旱缺水是严重威胁农业生产的重要气候因素。随着淡水资源的越来越贫乏,抗旱农作物品种的选育已越来越重要。有报道认为,全世界由于干旱所造成的粮食损失超过了其它不利因素损失的总和。植物的耐旱性主要由细胞膜的结构和某些酶的活性决定。Heyser和 Nabors首先应用 15%的 PEG加入培养基来选择抗旱细胞系,通过这一途径选出的番茄抗旱细胞系,在高渗条件下生长远比对照好,但失去高渗条件时,这一特性消失。由此可见,高渗条件下可能只是引起了生理适应性变异。Smith等从高粱种子诱导的愈伤组织中,筛选出了耐旱的再生植株并产生种子,其植株的外角质层的蜡质含量比对照有所增高,耐旱、耐热性比对照增强,但单株产量有所下降。冻害和冷害不仅影响作物产量,也影响作物的分布,我国在水稻、柑橘等作物中采用与抗旱突变体筛选类似的策略筛选耐寒和耐冷体细胞突变体,也取得一定进展。

2. 遗传研究

突变体用于基因克隆和标记筛选具有独特的优点。因为突变一旦发生,即可在表现型上与供体显著不同,通过差异显示或分子杂交筛选,即可快速获得突变位点的 DNA序列,经过测序与功能鉴定,就可能获得与突变性状相关的基因。即使通过分析不能获得功能基因,这些 DNA序列也可作为与突变性状相关的分子标记,用于相关遗传研究。

突变体用于基因克隆和功能鉴定早已成为模式植物如拟南芥等的常规方法,近年来也已开始广泛用于其它作物中。特别是与转座子标签插入突变技术相结合,更显现出这一途径的高效性。目前,利用突变体策略已分离出一些功能基因和抗病基因,如玉米乙醇脱氢酶基因 ADH,赤霉素合成相关基因 GA1、GA4,生长素敏感性基因 AUX1、AUX2,番茄抗病基因 Dfg等。有些突变体通过 DNA多态性分析,表现出丰富的遗传变异,通过特定 DNA标记与性状的连锁关系,即可对控制该性状的遗传规律进行研究。Reid (1990)用豌豆 5个减少 GA_1 合成的突变系和 8个对外源 GA_1 不敏感的突变系鉴定分析了 12个影响节间长度的基因,其中 9个基因突变可缩短节间长度,而另外 3个基因突变却导致节间伸长。

3. 发育生物学研究

植物的个体发育是一个渐进过程,每一个器官和组织的分化都是一个复杂的调控过程。关于植物发育的研究,在很长一段时间里只能停留在形态学和组织学观察的水平上,对于发育过程中的基因调控则很难进行。由于分子生物学研究技术和体细胞变异相结合,利用体细胞突变策略对植物发育的基因调控研究取得了突破性进展。特别是利用拟南芥和金鱼草等模式植物,已分离出一大批不同发育阶段和组织类型的突变体,包括顶端分生组织、根、开花转变、花序、花分生组织和胚胎发育等的一系列突变体。通过对这些突变体的研究,不仅建立了器官发育模式,而且分离鉴定了一大批与发育有关的基因,包括维持正常发育状态的基因、促进发育进程的基因以及相关修饰基因 (许智宏和刘春明,1998)。目前,以突变体为工具,还从组织学和细胞学角度分

析鉴定了一些基因表达与植物发育的关系,在烟草、玉米中均通过质体突变体,分离鉴定了与植物叶绿体发育有关的核基因。玉米黄化突变体 pun是一个在光照下不可逆转的突变体,分析显示,该突变体为一核单基因隐性突变,该基因的突变扰乱了叶绿体基因编码的蛋白质积累,进而使叶绿体膜系统发育不足,类囊体相关蛋白不能积累 (Roth等,2001)。

4. 生化代谢途径研究

生物的各种代谢活动涉及一系列酶相关基因的表达。如果某一代谢过程的关键酶基因突变,则会影响到下游代谢链的正常进行。因此,突变体作为代谢活动调控研究的工具,具有十分便利和高效的优势。体细胞突变技术的不断成熟,使多细胞生物大群体突变的建立成为可能。我们可以根据需要建立某一代谢途径中每一个调节点的突变体,也可以根据需要与基因工程相结合,对一些关键调控过程进行修饰和改造,使代谢过程按照人类需要进行。因此而发展起来的新型学科领域称之为代谢工程。植物突变体用于代谢研究,早期最经典的例子是通过烟草突变体对硝酸还原酶的研究。硝酸还原酶缺失突变体有两种类型:cnx和 nia, 两种突变体具有同一表现型,即在以硝态氮为唯一氮源的培养基上不能生存。但将这两种突变体的原生质体融合后,融合细胞即可在只有硝态氮源的培养基上生长。由此说明,两种突变体存在独立的基因位点,而不同位点的基因又可能通过不同的途径控制硝酸还原酶的活性。 cnx和 nia突变体分别通过影响钼因子和酶蛋白来影响硝酸还原酶的活性。近年来,通过体细胞突变研究激素、次生代谢产物等代谢途径已有许多报道。如有研究显示,番茄推迟成熟的突变体 Nr与乙烯应答基因突变有关 (Lanahan等,1994)。玉米胚乳皱缩型突变 (sh)可能涉及到蔗糖代谢的相关酶基因的突变,比较野生型和突变型的蔗糖合成酶和碱性转化酶活性,野生型的蔗糖合成酶活性比突变型高,而碱性转化酶活性则比突变型低 (何桌培,1997)。

离体培养中遗传的稳定性是相对的,而体细胞变异发生是普遍的,但变异的程度可以通过培养类型和条件进行控制,从而使我们能够更好地应用离体培养技术。选用适当的外植体和培养方式,减少体细胞变异发生,使培养群体维持遗传稳定,可以充分利用离体培养的快速繁殖优势繁殖健康种苗。将离体培养技术与诱变技术相结合,可以提高变异频率,增加变异选择的基础材料,丰富遗传资源。

思考题

1. 离体培养物的遗传变异有何特点?
2. 哪些因素会影响培养物的遗传变异?
3. 从细胞学和分子生物学机制上理解体细胞无性系变异的机制。
4. 体细胞无性系变异的诱导和选择方法。
5. 体细胞无性系变异的应用途径。

第三章

植物细胞工程技术原理

植物细胞工程是以组织和细胞的离体无菌操作为基础的实验性学科,它需要在一定的试验条件和特定的试验环境下完成一系列操作。以无菌条件为重要前提,模拟植物细胞生长发育需要的各种设施、设备、培养条件与技术,是从事本领域工作的基础。

第一节　实验室设置

任何一个实验室的建设均需考虑两个方面的问题:一是所从事的实验的性质,即是生产性或是研究性的、是基本层次的还是较高层次的;二是实验室的规模,规模主要取决于经费和实验性质。但无论实验室的性质和规模如何,实验室设置的基本原则是:科学、高效、经济和实用。对于一个细胞工程实验室它必须满足3个基本的需要,即:实验准备(包括培养基配制、器皿洗涤、培养基和器皿灭菌等)、无菌操作和控制培养。此外,可根据所从事的实验要求来考虑辅助实验室及其各种附加设施,使实验室更加完善。

一、实验室组成

1. 基本实验室

基本实验室包括准备室、接种室和培养室,是细胞工程实验所必须具备的基本条件。

⑴ 准备室　准备室的功能就是进行一切与实验有关的准备工作。这些工作包括器皿的洗涤,培养基的配制与分装,培养基和器皿的灭菌,培养材料的预处理等。准备室要求宽敞明亮,以便于放置多个实验台和相关设备,方便多人同时工作。此外,准备室要求通风条件好,便于气体交换。同时,实验室地面应便于清洁,并应进行防滑处理。根据需要和条件,准备室可设计成分体式或通间式。一般用作研究性质的实验室,可设计成分体式准备室,由分开的若干房间将准备室分解为药品储藏室、培养基配制与洗涤室和灭菌室等。这种设计的优点是各房间功能明确,便于管理,但不适于大规模生产操作。用于规模化生产的实验室,准备室一般设计成大的通间,使试验操作的各个环节在同一房间内按程序完成。这种设计的优点是准备试验的过程在同一空间进行,便于程序化操作与管理,试验中减少各环节间的衔接时间,从而提高工作效率。此外,大的准备间还便于培养基配制、分装和灭菌的自动化操作程序设计,从而减少规模化生产的人工劳动,更便于无菌条件的控制和标准化操作体系的建立。

⑵ 接种室　接种室的功能是进行材料的离体无菌操作。该实验室要求封闭性好,干燥清洁,能较长时间保持无菌。因此,接种室不宜设置在易受潮的地方,房间一般不宜过大,其规模根据实验需要和环境控制的难易程度而定。为便于消毒处理,内墙壁及地面等都应采用防水和耐

腐蚀的材料,如防水涂料和瓷砖等。地面要求平坦无缝,以便于清洁。为了保持清洁,接种室应防止空气对流。接种室内工作台的放置应避免工作面相对而置,防止因工作台面之间空气的对向流动所引起的交叉污染。一般新建实验室的接种室在使用之前应进行灭菌处理,处理方法可采用甲醛和高锰酸钾熏蒸。此外,接种室应定期灭菌处理。如果接种室环境控制较好,一般可每周用紫外线照射 1～2 h即可维持无菌状态,也可在每次使用前用紫外线照射 10～30 min。但在湿度较大的季节和地区,接种室还应定期熏蒸,以保持良好的无菌环境。

⑶ 培养室　培养室的功能是对离体材料进行控制条件下的培养。无论是研究性实验室还是生产性实验室,培养室均是不可缺少的组成部分。培养室的基本要求是能够控制光照和温度,并保持相对的无菌环境。因此,培养室应保持清洁和适度干燥。对于研究用实验室而言,通常可根据光照时间设置成长日照、中日照和短日照培养室,也可以根据温度设置成高温和低温培养室。每一个培养室的空间不宜过大,以便于环境的均匀控制。为节省空间和能源,培养室应配置适宜的培养架。此外,为满足培养材料生长对气体的需要,在必要时还应安装培养室的换气装置。对于某些精细培养类型如细胞培养和原生质体培养等,也可以采用光照培养箱或人工气候室代替培养室,但因为这些设备的空间有限,一般在植株再生后均需要移入较大空间的培养室继续培养。

2. 辅助实验室

辅助实验室是根据研究或生产的需要而配套设置的专门实验室,主要用于细胞学观察和生理生化分析等。

⑴ 细胞学实验室　细胞学实验室的功能是对培养材料进行细胞学鉴定和研究。细胞学实验室由制片室和显微观察室组成。制片是获取显微观察数据的基础,制片室一般配备有切片机、磨刀机、温箱以及样品处理和切片染色的设备等。由于制片过程中所用药品常常是一些具有一定危害的苯、醛类物质等,制片室应安装通风橱,并有相应的废液处理设施。显微观察室放置的设备主要是各种显微镜和图像拍摄、处理设备,因而要求房间清洁、明亮、干燥,防止潮湿和灰尘污染。

⑵ 生化分析实验室　在以培养细胞产物为主要目的的实验室中,应建立相应的分析化验实验室,以便于对培养物的有效成分随时进行取样检查。对于一些大型的次生产物生产实验室,还应建立有效物质分离实验室。因此,生化分析实验室的规模和性质需根据整体研究或生产的需要而定。

3. 实验室布局

细胞工程实验室的布局是非常重要的,布局是否合理不仅影响到是否经济,更重要的是会影响到是否能满足实验要求。实验室布局应在实验室建筑设计时确定,其基本要求是:便于隔离,便于操作,便于灭菌和便于观察。为了满足这几个要求,实验室的布局可根据细胞工程实验的操作程序安排实验室排列。接种室、培养室应放在与外界环境隔离的区域,使之能较长时间保持无菌状态,从而免除频繁消毒的麻烦。灭菌室应与接种室相邻,以便于将灭菌后的培养基及用品直接放置于接种室,尽可能免除再污染。其它实验室的布局可根据条件,以方便实用为宜。

植物细胞工程实验室布局示意图见图 3.1。

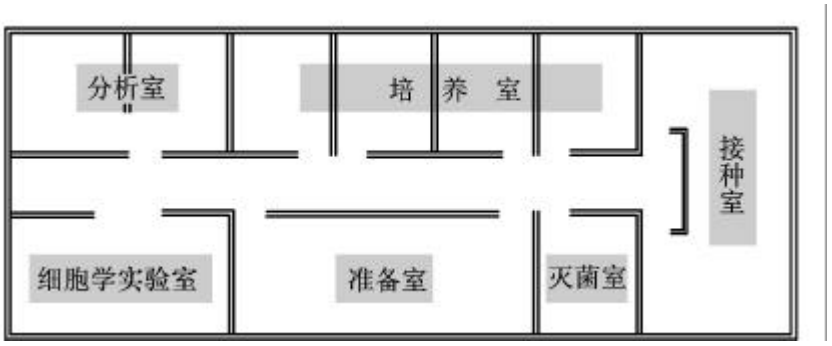


图 3.1 植物细胞工程实验室布局示意图

二、基本设备配置

1. 常规设备

常规设备主要是用于试剂保存与称量、培养基配制与分装和水处理等,根据实际需要予以配置。

⑴ 天平 根据实验需要,一个细胞工程实验室需配备 2~3台不同精度的天平。0.001或0.0001感量的天平,用于一些需要量少的微量元素以及一些需要较高精确度的实验药品的称量。0.01或 0.1感量的天平,用于大量元素母液配制和一些用量较大的药品的称量。

⑵ 冰箱 各种维生素和激素类药品以及培养基母液均需低温保存,某些试验还需对植物材料进行低温处理,在一般情况下均可利用普通冰箱完成。实验室一般配备冰箱 1~2个,一个用于药品的贮藏,一个用于保存培养基母液以及用作某些植物材料的低温处理。

⑶ 酸度计 酸度计用于测定培养基以及其它溶液如酶制剂等的 pH,其精度要求因试验需要而定,一般要求可测定 pH范围在 1~14之间,精度 0.01即可。

⑷ 离心机 离心机用于细胞、原生质体等活细胞分离,亦用于培养细胞的细胞器、核酸以及蛋白质的分离提取。根据分离物质不同配置不同类型的离心机,如用于细胞、原生质体等活细胞的分离一般选用低速离心机,而核酸、蛋白质的分离则要选择高速冷冻离心机。以规模化培养生产次生产物的实验室,还应选择相应的大型离心分离系统。

⑸ 加热器 加热器用于培养基的配制。研究性实验室一般选用带磁力搅拌功能的加热器,规模化大型实验室则应选用大功率加热和电动搅拌系统。有时,亦可用电炉代替加热器,但必须选用适当功率和安全性能好的电炉。对于一些小量培养基的配制也可用微波炉溶化蔗糖和琼脂,但分装前必须充分搅拌均匀。

⑹ 纯水器 离体培养应使用符合试验要求的纯水或蒸馏水。用于一般培养,可使用 4级过滤的反渗透纯水器,也可使用蒸馏水器。对于一些精确培养试验,有时需要使用双蒸水或超纯水,应配备更高一级的纯水设备。

⑺ 分装设备 分装设备用于培养基分装。培养基分装可以采用手工分装和自动分装。手工分装一般只适用于小型试验,对于一些较严格的试验也可辅助使用定量分装瓶或注射器,以便使每一容器的培养基均等。而对于一些大型生产实验室,则需要使用相应的培养基分装设备。选择分装设备主要根据实验规模和精度而定,而选择的分装设备最好能有较大的可调节范围,以便适于不同试验的需要。

2. 灭菌设备

维持相对的无菌环境是细胞工程实验室的基本要求。因此,与消毒灭菌有关的设备是必不可少的。灭菌设备包括高压蒸汽灭菌锅、干热消毒柜、过滤灭菌装置、喷雾消毒器和紫外灯等。高压蒸汽灭菌锅是常用的主要灭菌设备,一般用于培养基、玻璃器皿以及其它可高温灭菌用品的灭菌,根据实验室规模大小可选择手提式、立式、卧式等不同规格的产品 (图 3.2)。

图 3.2　不同类型的高温灭菌锅

干热消毒柜用于一些金属工具如镊子、剪刀、解剖刀等的灭菌,亦可用于玻璃器皿的灭菌,一般可选择温度 200℃左右的普通或远红外消毒柜。过滤灭菌器用于一些酶制品、激素以及某些维生素等不能高温灭菌试剂的灭菌。根据试剂量的大小可选择不同体积和类型的过滤灭菌器,主要有真空抽滤式和注射器式两大类。紫外灯是方便、经济的控制无菌环境的装置,一般安装在细胞工程实验室的各个房间,特别是接种室和培养室是必须安装的场所,细胞工程实验室的缓冲区一般亦应安装紫外灯。

3. 无菌操作设备

无菌操作设备主要有净化工作台、接种箱等。接种箱是较早使用的最简单的无菌装置,实际上是一个按需要设计的玻璃箱罩,前方出入口处装有特殊材料的袖罩,箱内安装有用于灭菌和照明的紫外灯和日光灯。当使用接种箱时,对接种室的无菌环境要求更高,否则易造成接种过程的污染。目前,除少数微生物实验操作外,以动植物为材料的无菌操作基本已不使用接种箱。净化工作台是现在普遍使用的无菌操作设备,它是采用经双重吸附过滤后的空气,按一定风速净化操作台面的原理设计的。净化工作台的操作台面是一个半开放区,因此具有使用方便、操作人员舒适等优点。通过过滤的空气连续不断地经台面吹出,微生物很难在工作台的操作空间停留,从而保持了较好的无菌环境。由于工作台是以过滤器吸附微生物的方式来达到净化效果,使用一定时间后会引起过滤网的堵塞而影响空气净化,因此,过滤网需要按设计要求定期更换。常用的净化工作台形式如图 3.3所示。

4. 培养设备

培养设备是指根据需要所选用的不同规格和控制精度的用于植物细胞、组织或器官培养的设施和设备,包括培养架、培养箱、摇床、生物反应器等。其中培养架由于成本低,设计灵活,可充分利用培养室空间等优点,是目前所有植物细胞工程实验室植株繁殖培养的通用设施。培养架

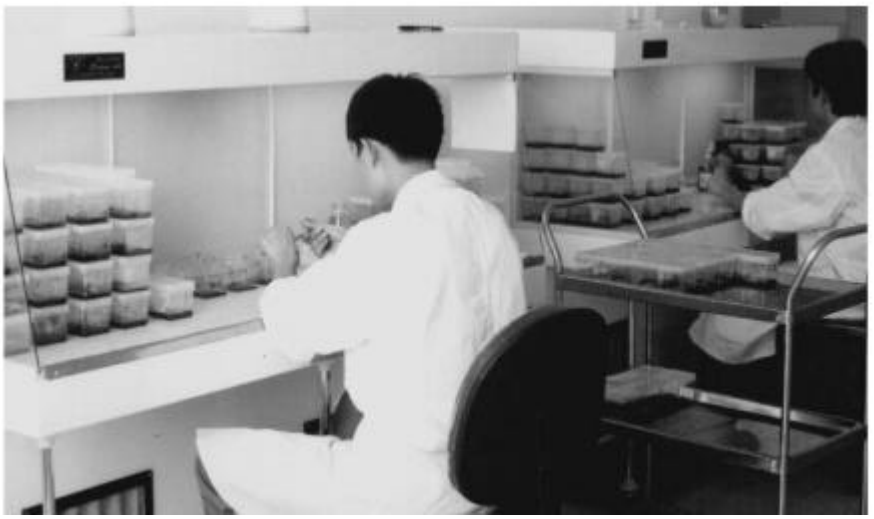


图 3.3 组织培养净化工作台

的设计以操作方便、最大限度利用培养室空间为原则，其长度可根据房间大小和灯管长度灵活设计，宽度以不超过臂长为宜，以便于操作。培养架可根据培养室房间的高度设计成 4～5层，每层间隔 40～50 cm。光照强度可根据培养植物的特性确定，以每平方米面积的照度计算，然后确定每层培养架需要安装的灯管数。培养架所安装的灯管通常为冷光源荧光灯管，以避免因为光源发热而造成培养空间温度不匀，影响培养物的生长。由于灯管一般安装在上一层隔板下方，因而常使上层隔板温度升高，因此培养架间隔板最好设计成双层中空型，以避免放置培养物的隔板局部温度上升。培养架的通用形式如图 3.4所示。

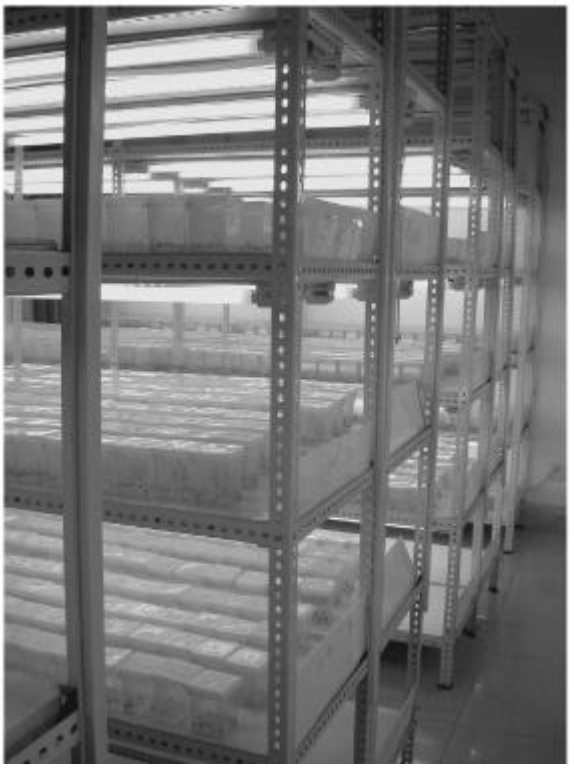


图 3.4 植物组织培养室培养架

对于一些要求精确控制的培养实验如细胞培养、原生质体培养等，在培养初期至成苗前需要在培养箱中培养，以便于温度、光照等条件的精确控制。植物培养箱一般采用光照培养箱，其光照强度和时间可按实验需要设置并能自动控制。对于某些特殊需要的培养亦可选择 CO_2 培养箱、湿度控制培养箱等。在进行液体培养时，为了改善通气状况，可选择使用振荡培养箱或摇床。选择此类设备时，应注意根据植物细胞特点选择适宜的振荡频率和振幅。利用植物细胞生产次生产物的细胞工程实验室，需根据培养规模选用适宜的生物反应器。

5. 其它设备

为保证光照、温度的准确控制，培养室需安装时间程序控制器、温度控制系统等，以控制光照时间和温度。比较小型的实验室，温度控制亦可选择使用空调。因为空调本身的温度控制只是一个大致范围，不能满足实验要求，所以利用空调控制温度时，最好改装空调的温度感应器，使用外接温度感应器替代。此外，根据实验需要选择配置相关显微镜，包括实体显微镜、倒置显微镜以及其它显微镜等。为了获取图像资料和数据，一般还需配置与显微镜配套的摄影、录像和图像

处理设备。根据实际需要,细胞工程实验室还应配备有用于物质分析的提取、纯化和含量分析设备,如离心机、电泳仪、萃取和层析设备、紫外分光光度计、高效液相色谱仪、气相色谱仪和酶联免疫吸附测定仪等。

三、培养容器与用具

培养容器是指盛有培养基并提供培养物生长空间的无菌器皿,培养用具是指培养物接种封口所用的各种金属或塑料制品,这是任何细胞工程实验室所必须具备的条件。

1. 培养容器

图 3.5　植物组织培养常用容器

⑴ 玻璃容器　在一般情况下,各种玻璃容器均可用于植物材料的培养,特别是一些快速繁殖培养的类型,根据培养材料的体积可选择各种玻璃容器。但为了保证培养效果以及某些要求严格的培养类型,应尽量选择无色并不产生颜色折射的玻璃容器。用于细胞、原生质体培养的玻璃容器以硼硅酸盐玻璃材质为宜,避免选择钠玻璃。玻璃容器的大小与形状,通常是根据培养物的体积、培养性质以及操作者的习惯而定。通常使用的培养容器包括各种规格的培养皿、三角瓶和试管等。某些特殊培养亦使用 T—型管、角形瓶和 L—型管等,有时可根据需要而设计制作特殊的培养器皿。通常使用的玻璃容器类型见图 3.5。

⑵ 塑料容器　塑料因其材质轻、不易破碎以及制作方便等优点,已在国内外许多实验室广泛使用。塑料培养容器根据材料性质不同可分为两类,一类是一次性使用的容器,另一类是可重复使用的容器。一次性使用的塑料容器,其制作材料只考虑其透光性和无毒性,一般多为聚乙烯、聚丙烯材料。在容器制作完成后即进行灭菌处理,无菌包装,使用时勿需进行灭菌,使用方便。但一次性容器在大量培养使用过程中,废弃容器的处理与回收目前还没有很好解决。另外,一次性使用的实验成本亦较高,不适于规模化生产的需要。可重复使用的塑料培养容器一般选用可高温灭菌的特殊材料制作,如聚丙烯、聚碳酸酯材料等,其制作成本比一次性容器高,但由于具有材质轻、可反复使用、不易破碎等优点,越来越受到更多实验室的青睐。如华中农业大学马铃薯实验室,通过改进国外同类产品的局部结构,采用可高温灭菌的聚碳酸酯材料,设计制作了用于各类植物快繁培养的方形培养容器,在透光性、透气性方面均有很大提高,现已在许多植物组织培养实验室使用。

2. 金属用具

细胞工程实验室的接种以及解剖工具,通常使用金属制品,一般多选用医疗器械的相应工具,如镊子、剪刀和解剖刀等。

⑴ 镊子　根据试验需要,可选用各种类型的镊子,如小的尖头镊子,适用于植物组织解剖,对于取一些较小的组织、器官等尤为适用。而对于继代培养中的转管操作,则选用枪形镊子较好,因为其中部弯曲,比较容易深入到容器中取出培养物,特别是使用三角瓶进行培养时,枪形镊子更显方便。

⑵ 剪刀 剪刀通常选用不锈钢医用剪刀,多用于植物材料的切段转移繁殖,亦用于某些试验的取材,一般的解剖剪和弯头剪均可选用。

⑶ 解剖刀 解剖刀一般用于组织切段。通常选用刀片可更换的医用不锈钢解剖刀,植物细胞工程以短柄解剖刀较为方便。

⑷ 其它工具 其它工具包括接种铲、接种针等。一般在进行花药培养、花粉培养以及愈伤组织操作时使用这类工具。此外,有时为了从多肉组织内部取材,亦使用打孔器,可根据需要选择不同口径。

3. 塑料用具

塑料用具包括各类塑料封口膜、盖、塑料盘以及实验室使用的其它塑料用品。塑料封口膜是近年来取代传统的棉塞封口的实验用品,它具有经济方便、不易污染等优点。一般选用对生物无毒且耐高温的塑料膜,目前市场上已有各种规格的封口膜出售。如果培养容器规格一致,亦可选用塑料盖封口,特别是以试管为培养容器时,塑料盖更方便。实验室无需特殊处理的各类盘子、架子等,现多选用更经济耐用的塑料制品。

第二节 细胞工程的基本技术

一、洗涤技术

培养器皿和用具的洗涤是保证培养物正常生长的重要环节。使用不洁的培养器皿和用具,可能影响培养基的组成成分,甚至导致实验的失败。培养器皿和用具的洗涤应选择适当的洗涤剂,采用科学的洗涤方法。

1. 洗涤剂

洗涤剂的种类很多,配制方法也各不相同,可根据要求选择经济而有效的洗涤剂。在大多数情况下,实验室一般使用两类洗涤剂,一是合成洗涤剂,二是铬酸洗涤剂。合成洗涤剂可从市场直接购买使用,而铬酸洗涤液则需在实验室配制。

铬酸洗涤液是用重铬酸钾 ($K_2Cr_2O_7$) 与硫酸 (H_2SO_4) 配制而成,可根据需要配制成弱、中、强三种浓度。强的铬酸洗涤液一般情况下很少使用,配制时亦需特别小心。新配制的铬酸洗涤液呈棕红色,应贮存于防酸、耐热、开口较大的塑料或玻璃容器内。不同浓度的铬酸洗涤液配制方法如表 3.1所示。

表 3.1 常用的铬酸洗涤液配方

成 分	强酸溶液*	中酸溶液**	弱酸溶液**
重铬酸钾/g	63	120	100
硫酸/ml	1 000	200	100
蒸馏水/ml	200	200	1 000

*配制方法:在蒸馏水中缓慢加入浓硫酸,加热的同时分次加入磨碎的重铬酸钾至其完全溶解。

**配制方法:重铬酸钾加蒸馏水后加热溶化,冷却后再缓慢加入浓硫酸。

铬酸洗涤液是强氧化剂，去污能力很强，特别是在加热后去污效果更好，一般可加热到 40～45℃使用。但铬酸洗涤液同时具有较强的腐蚀性，使用时应十分谨慎，以免发生意外。铬酸洗涤液仅用于玻璃试验器皿的洗涤，可反复使用，直至溶液呈青褐色为止。

现在市场上已有特殊的化学去污剂，如美国生产的“Micro－90”清洁液，可以代替铬酸洗涤液，已在一些实验室中开始使用。

2. 洗涤方法

⑴ 玻璃器皿洗涤　新的玻璃器皿上附有游离的碱性物质，其洗涤方法是用 1%的 HCl溶液浸泡一昼夜，再用合成洗涤剂洗刷，然后用清水反复冲洗，最后用蒸馏水冲洗 1～2次，干燥后即可使用。已使用过的试管、烧杯和三角瓶等的洗涤方法是：先将器皿中的残渣除去，用清水洗净，再用合成洗涤剂洗刷，用清水冲洗干净，最后用蒸馏水冲洗 1～2次。用过的吸管、滴管等内径狭小的玻璃制品，需先放入铬酸洗涤液中浸泡 2h以上，取出后经流水冲洗 0.5 h左右，再用蒸馏水冲洗 1～2次，然后烘干或晾干。载玻片和盖玻片容易破碎，洗涤时不宜用力擦洗，其洗涤方法是：先用清水冲洗，然后放入铬酸洗涤液中浸泡几小时或用稀铬酸洗涤液煮沸 0.5 h，取出后用清水冲洗干净，将其储藏在 95%的酒精中。

⑵ 塑料用品洗涤　塑料用品一般用合成洗涤剂洗涤，因其附着力较强，因此冲洗时必须反复多次，最后用蒸馏水冲洗。

⑶ 金属用品洗涤　金属用品一般不宜用各种洗涤液洗涤，需要清洗时，一般用酒精擦洗，并保持干燥。

二、灭菌技术

灭菌是指杀灭培养物、培养基、培养用具及培养环境的杂菌，是防止微生物污染的最重要、最基本的环节，是植物细胞工程技术中首先必须注意的问题。所用的培养基、培养器皿、各种操作工具及培养材料都要进行灭菌。灭菌一般有物理方法和化学方法两种。物理方法是利用高温、射线等杀死微生物或通过过滤、离心沉淀等去除微生物。化学方法主要是使用消毒剂、抗菌素杀灭微生物。在实际工作中，需根据不同的材料和要求选用相应的灭菌处理方法。

1. 培养基灭菌

培养基一般采用高压蒸汽灭菌或过滤灭菌。高压蒸汽灭菌通常是采用压力灭菌装置或高压灭菌锅，将分装好的培养基放在一个大的灭菌容器中，在压力为 0.1013 MPa，温度为 121℃的条件下进行灭菌处理。灭菌时间与容器大小及其含有的培养基量有关（表 3.2）。培养基的灭菌时间和温度应严格控制，时间不足或低于灭菌温度可能造成灭菌不彻底而使培养基污染；时间过长或温度过高，则又可能产生许多不利影响，诸如引起培养基成分的分解或无机盐的沉淀，有时还会引起糖类物质的焦化而产生有毒物质，固体培养基灭菌时间过长还会使琼脂不凝固等。有些培养基附加成分，如植物浸提液、某些激素等在高温下容易使有效成分失活或分解，这时需采用过滤除菌的方法单独过滤后，再加入到已经灭菌的培养基中。

2. 玻璃器皿灭菌

玻璃器皿可任选湿热和干热灭菌方法灭菌。湿热灭菌条件与培养基灭菌条件一致，但要适当延长灭菌时间，一般以 25～30 min为宜。湿热灭菌后器皿和包装表面常常有水蒸汽覆盖，如果不及时干燥常常容易造成微生物的再侵染。因此，器皿灭菌后应及时放入净化工作台上吹干。

目前,有些自动控制灭菌锅本身即带有表面干燥程序,只需在灭菌前设置好需要的灭菌和干燥的条件,即可一次完成。干热灭菌,即在烘箱中加热至 160~180℃后恒温保持 40 min,或 120℃灭菌 2 h。玻璃器皿放入烘箱之前必须完全干燥,以免引起破碎,灭菌时温度要缓慢上升,灭菌后待温度逐渐下降到 60℃以下时才能开箱门,以免器皿因突然冷缩而破碎。

表 3.2 培养基体积与灭菌时间的关系

培养基体积/mL	灭菌温度/℃	灭菌时间/min
20~50	121	20
50~500	121	25
500~5 000	125	35

3. 金属用具灭菌

在进行植物组织分离时常用的工具多是金属制品,使用前和使用过程中均必须灭菌并保持无菌状态。使用前的灭菌可采用干热灭菌。使用过程中的灭菌通常是将其浸泡在 70%的酒精中,再以火焰将酒精烧去,待冷却后使用。现在许多实验室使用一种小型电热石英砂灭菌器,是一种十分方便的设备。它可以代替酒精,从而免除了使用酒精的危险。目前,国内亦有厂家生产类似灭菌器并已投入市场。

4. 操作环境灭菌

细胞工程实验室的整个环境均应维持相对的无菌状态。因此,一个新实验室在投入使用前必须经过彻底的消毒灭菌处理,其灭菌方法可以通过气体熏蒸或紫外线照射。熏蒸剂常用甲醛加高锰酸钾,可用每 100 mL甲醛加 5 g高锰酸钾为一个使用单位,具体做法是在每 20 m^2 的范围内放置 1个单位剂量。为避免其气体对人体的危害并达到较好的消毒效果,一般熏蒸期间应将实验室封闭 3~5 d。以后在使用过程中,接种室还应定期熏蒸。实验室每次使用前还可喷洒 75%的酒精、过氧乙酸或 2%的新洁尔灭溶液,或用紫外灯照射 0.5 h,以保证接种室的无菌环境。其它操作室的环境控制可根据情况选用紫外灯定期照射或其它消毒方法。

第三节 培养基组成及配制

植物生长发育中,至少有 16种基本元素是必需的,它们是氮(N)、磷(P)、钾(K)、钙(Ca)、镁(Mg)、硫(S)、铁(Fe)、锰(Mn)、硼(B)、铜(Cu)、锌(Zn)、钼(Mo)、氯(Cl)、碳(C)、氢(H)和氧(O)。这些必需元素在体内的生理作用主要包括 4个方面:一是组成各种化合物,参与机体的建造,成为结构物质;二是构成一些特殊的生理活性物质,如植物激素、酶以及酶的活化剂,参与植物的代谢活动;三是这些元素之间相互协调,以维持离子浓度平衡、胶体稳定及电荷平衡等生物电化学方面的作用;四是在发育过程中,影响组织器官的建成。

离体培养条件下,各种营养元素主要从培养基中获得,如 O和 H元素主要从水中获得,C来源于添加的糖类,其它矿质元素则来自组成培养基的无机盐。不同植物种类对营养的需求有一定的差异,甚至同一种植物的不同组织和器官所要求的营养条件也不完全一样。因此,培养基的

配方是决定培养物能否正常生长或是否能达到培养目的的首要前提。经过大量的科学研究,到目前为止已有多种针对不同培养类型和培养材料的培养基可供选择。尽管这些培养基的配方各不相同,但总体来讲,除根据特殊需要所添加的其它附加成分外,用于植物离体培养的培养基一般包括无机盐、有机化合物和生长调节剂三大基本组成成分。

一、培养基成分

1. 无机盐类

根据植物对必需元素所需要的量,培养基的无机成分可分为大量元素(macroelement)和微量元素(microelement)。培养基的大量元素使用量一般在每升几十至几千毫克。大量元素包括碳、氢、氧、氮、磷、钾、钠、钙、镁和硫。微量元素的需要量则很小,稍多即有产生危害的可能。但微量元素又是植物生长发育所必需的物质,缺少时植物不能完成正常的生理功能。微量元素的用量一般低于 10^{-5} ~10^{-7}mol/L。植物所需的微量元素有铁、铜、锌、硼、钼、锰和钴(Co)等。不同植物生长发育所需的无机盐在数量上可能存在一定差异,但从无机盐的类型上看,所有植物是一致的。

除 C、H、O外,其它矿质元素通常是以一定浓度的无机化合物形式,按一定的比例配制而成。当这些无机盐溶解于水时,即以离子的形式提供相应的元素供培养物吸收。一种类型的离子可以由一种以上的无机盐提供,如在常用的 MS(Murashige和 Skoog, 1962)培养基中,NO_3^- 离子既可以由 NH_4NO_3 提供,也可以由 KNO_3 提供。而 K^+离子既可以由 KNO_3 提供,也可以由 KH_2PO_4 提供。培养基的这一特点,不仅保证了培养物生长所需的各种营养元素的离子平衡,同时也可避免由单一化合物提供某一营养元素时,在培养中因培养物对不同离子的吸收差异而产生的培养基 pH的剧烈变化。如单一使用 NO_3^- 时,常会使 pH 升高,而单独使用 NH_4^+ 时则会使 pH 降低。

2. 有机化合物

培养基中若只含有无机盐类(包括大量元素和微量元素),常称之为基本培养基。为使培养物更好地生长或适于不同的培养需要,培养基中还需添加一些有机成分。常用的有机成分主要包括糖类、维生素、醇类、嘌呤和氨基酸等。

(1) 糖类　糖(sugar)是离体培养中培养物生长与发育不可缺少的有机成分,在培养基中加入一定浓度的糖,既可作为 C源,又可维持培养基的渗透压(osmotic pressure)。植物组织培养中常使用蔗糖(sucrose),使用浓度因培养目的和培养类型不同而有很大差异,如一般试管苗生长与繁殖常使用 2% ~3%的蔗糖浓度,但在大多数植物的幼胚培养中蔗糖浓度可使用到 4% ~6%。某些特殊培养中,蔗糖浓度甚至可提高到 8% ~10%。除蔗糖外,在细胞和原生质体培养中,为了保证培养物的良好生长,还需配合使用麦芽糖(amylomaltose, maltose或 malt sugar)、葡萄糖(glucose)、果糖(fructose)、纤维二糖(cellobiose)或甘露糖(mannose或 seminose)等。

(2) 维生素　维生素(vitamin)直接参与生物催化剂——酶的形成,还参与植物蛋白质、脂肪的代谢等重要生命活动。在离体培养条件下,大多数培养的细胞都能合成所有必需的维生素,只是在数量上显然不足。为了使培养物良好生长,根据培养目的不同,常在培养基中添加一种或多种维生素。离体培养常用的维生素包括硫胺素(thiamine, VB_1)、吡哆醇(pyridoxin, VB_6)、烟酸(nicotinic acid, Vpp)、生物素(biotin, VH)、泛酸钙(Ca-pantothenate)、叶酸(folic acid)、维生

素 C (vitamin C)等。

⑶ 肌醇 肌醇 (inositol)的化学名称为环己六醇,其本身并没有促进生长的作用,但它在糖类的相互转化、维生素和激素的利用等方面具有重要的促进作用,因而能使培养物快速生长,对胚状体和芽的形成有良好的影响。在培养基中加入 1mg/L的肌醇就足以影响维生素 B_1 的效应。肌醇的用量一般为 50~100mg/L。

⑷ 腺嘌呤 腺嘌呤 (adenine)的作用首先是 Skoog和 Tsui(1948)发现的,他们在实验中观察到,使用腺嘌呤能够刺激烟草茎段不定芽的发生。以后的研究表明,腺嘌呤是合成各种细胞分裂素的前体物质之一。外源添加腺嘌呤,具有促进细胞自身合成细胞分裂素的功能,有利于细胞的分裂和分化,促进芽的形成和生长。

⑸ 氨基酸 氨基酸 (amino acids)是蛋白质的组成成分。常用的氨基酸为甘氨酸 (glycine)及多种氨基酸的混合物如水解酪蛋白 (casein hydrolysate)、水解乳蛋白等。

上述有机化合物,除了蔗糖和肌醇通常在所有的培养基均需要添加外,其它成分则根据培养类型和培养目的确定是否需要添加。原则上讲,一般以快速繁殖为目的增殖培养,常可以略去除蔗糖外的所有有机成分,而细胞培养、原生质体培养、愈伤组织诱导等则需要添加复杂的有机物。此外,在以生产次生产物为目的的培养中,常需要添加一些与目的产物有关的前体有机物,不同培养类型的有机物需求及其作用将在相应章节具体介绍。

⑹ 其它复合成分 天然提取物是常用的复合添加成分,包括椰乳、番茄汁、酵母提取物 (yeast extract, YE)等,水解酪蛋白和水解乳蛋白亦是常用的复合成分。这些复合成分对培养物的生长具有较好的辅助作用,但由于成分复杂,特别是天然提取物的质量常受产地、季节、气候等因素的影响而不稳定,其成分的一致性不易掌握,从而容易造成实验的重复性差。因此,许多研究者认为,在植物细胞工程的相关研究中,应尽量使用性质稳定、成分清楚的化合物。

3. 生长调节物质

生长调节物质包括天然植物激素 (phytohormone)和人工激素类似物。植物激素是一类植物自身合成、同时对其生长发育具有重要调节作用的有机化合物。人工激素类似物则是根据天然激素的化学结构,通过化学或生物学方法人工生产的。生长调节物质对于离体培养中的细胞分裂和分化、器官形成与个体再生等均起着重要而明显的调节作用。一般来讲,基本培养基只能保证培养物的生存,维持其最低的生理活动,只有植物激素的配合使用,才能完成离体培养中按照需要设计的各个调节环节。培养中常用的植物生长调节物质见表 3.3。

⑴ 生长素类 离体培养中,生长素 (auxins)的主要生理作用是促进细胞分裂和生长,有利于外植体脱分化并启动细胞分裂,有利于形成愈伤组织 (callus)。同时,生长素与细胞分裂素 (cytokinin)的协调作用,对于培养物的形态建立亦是十分必要的。在离体培养的分化调节中,生长素促进不定根的形成而抑制不定芽 (adventitious shoots)的发生。在液体培养中,生长素还有利于体细胞胚胎发生 (somatic embryogenesis)。常用的生长素有 IAA、NAA、2,4-D和 IBA (吲哚丁酸)等。IAA为广泛分布于植物中的天然生长素,在受光和高压灭菌时稳定性较差。而 NAA、IBA、2,4-D等人工合成的生长素类似物则较稳定,且相对活性较强,因此,这些人工合成的生长素类物质常用于各类培养中。需要注意的是,在使用 2,4-D时,必须严格控制使用浓度和培养时期,因为高浓度的 2,4-D常常抑制器官的发生,在分化培养时不能使用 2,4-D代替其它生长素。

表 3.3　常用的植物生长调节物质

中文名称	英文名称	缩写	相对分子质量	溶剂
ρ－氯苯氧乙酸	ρ－chlorophenoxy acetic acid	ρCPA	186.6	乙醇
2,4－二氯苯氧乙酸	2,4－dichlorophenoxy acetic acid	2,4－D	221.0	乙醇
吲哚乙酸	indole－3 acetic acid	IAA	175.2	1mol/L NaOH
吲哚丁酸	indole－3 butyric acid	IBA	203.2	1mol/L NaOH
α－奈乙酸	α－naphthalene acetic acid	NAA	186.2	1mol/L NaOH
β－奈氧乙酸	β－naphthoxy acetic acid	βNOA	202.3	1mol/L NaOH
腺嘌呤	adenine	A	189.1	H_2O
硫酸腺嘌呤	adenine sulphate	—	404.4	H_2O
6－苄基腺嘌呤	benzyladenine	BA	225.2	1mol/L HCl
异戊烯氨基嘌呤	isopentenylaminopurine	2ip	203.3	1mol/L HCl
玉米素	zeatin	ZT	219.2	1mol/L HCl
激动素	kinetin	KT	215.2	1mol/L HCl
赤霉素	gibberellic acid	GA	346.4	乙醇
脱落酸	abscisic acid	ABA	264.3	1mol/L NaOH
苯基噻二唑基脲	thidiazuron	TDZ	220.2	1mol/L HCl

⑵ 细胞分裂素类　细胞分裂素的主要作用是促进细胞的分裂，调节器官分化，延迟组织衰老，增强蛋白质合成等。此外，它还能显著改善其它激素的作用。离体培养中，细胞分裂素能够促进不定芽的发生，与生长素协调使用可以有效调控培养物的生长与分化。常用的细胞分裂素包括：BA（6－benzyladenine or 6－benzylaminopurine，6－苄基嘌呤）、KT（kinetin，激动素）、2ip（isopentenylaminopurine，异戊烯氨基嘌呤）、ZT（zeatin，玉米素）等。近年来苯基噻二唑基脲（thidiazuron，TDZ）亦作为一种新的细胞分裂素类似物在许多离体培养研究中使用。

⑶ 赤霉素类　赤霉素是一类广泛存在于植物体内的激素，目前已发现的天然赤霉素有 20 多种。自然植物体内的赤霉素具有促进细胞伸长生长、诱导花芽形成、打破种子休眠以及诱导单性结实等生理功能。目前，商品生产的赤霉素多为赤霉酸（gibberellic acid，GA_3），因此，GA_3 是离体培养中常用的赤霉素类型。在离体培养条件下，赤霉素的主要作用是促进细胞的伸长生长，与生长素协调作用对形成层的分化具有一定影响，同时还能刺激体细胞胚进一步发育成植株。在某些情况下，赤霉素对于生长素和细胞分裂素具有一定的增效作用。在大多数情况下，培养物本身的内源赤霉素已能满足其生长发育的需要，只在一些特殊情况下才需外源添加赤霉素，其使用浓度必须严格控制。

糖、无机盐、生长素和细胞分裂素对培养物生长的影响见图 3.6。

4. 水

水是生物一切生命活动不可缺少的重要成分，任何生命活动只有在一定的细胞水分含量状态下才能正常进行。离体培养中，水既是培养基营养成分的溶剂，又是培养基的重要组成部分，它占培养基成分的 95%。天然水或一般自来水不能直接用于培养基配制。出于经济目的的考虑，根据培养类型及其研究层次不同，可选择使用不同处理级别的水。如原生质体培养、细胞培养以及分生组织培养，一般应使用双蒸水或超纯水，以免水中残留的离子造成培养基成分的变化

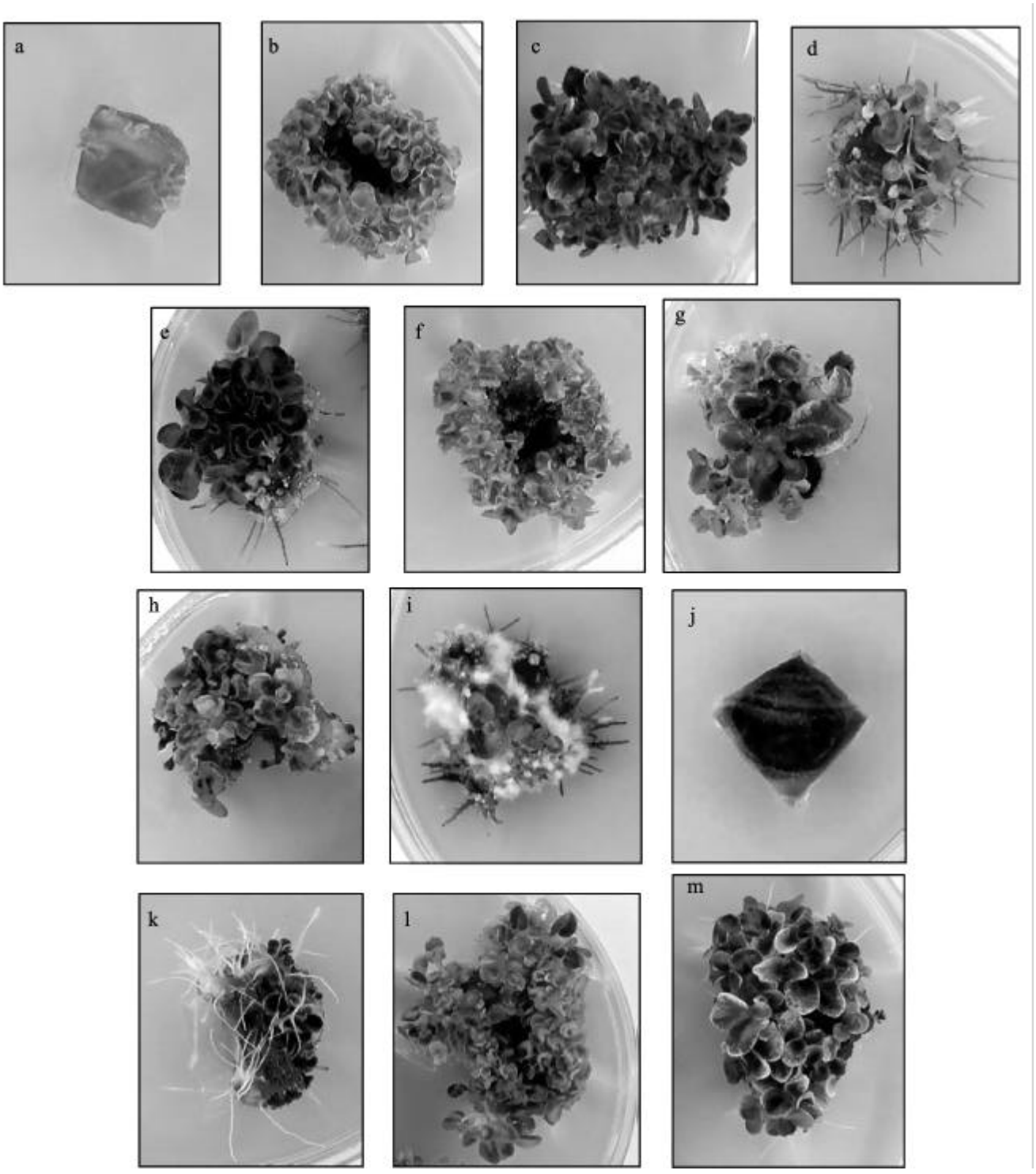


图 3.6 培养基营养成分对非洲紫罗兰组织培养的影响

m(对照):培养基为 MS附加 0.5mg/L NAA、0.5mg/L BA、3%蔗糖和 1%琼脂;a, b, c:蔗糖浓度分别为 0(少量芽分化,无根)、1%(芽在外植体上部边沿分化,有根形成)、5%(植株分化正常);d, e, f:BA浓度分别为 0(过量根分化;芽分化减少)、0.1mg/L(芽、根分化较平衡)、5.0mg/L(根分化减少);g, h, i:NAA浓度分别为 0(芽分化弱,无根)、0.1mg/L(芽分化弱,无根)、5.0mg/L(少芽,过量根分化);j, k, l:MS无机盐为 0(外植体无分化迹象)、1/10(少量根生化,芽分化受阻)、2×(芽在外植体表面分化,无根)

引自 http://www.liv.ac.uk/sd21/tissult/

而影响培养效果。如果是大批量的快速繁殖培养,则可使用一般蒸馏水或纯净水,以降低生产成本,提高生产效益。

实验室存放各类试验用水的容器应使用塑料制品,不能使用金属容器。存放容器应定期清洗,避免青苔和微生物滋生。玻璃容器亦不适于存放蒸馏水或纯净水,因为良好的透光性常常容

易使青苔生长。

5. 其它附加成分

⑴ 琼脂　琼脂（agar）是一种来自海藻的多糖类物质，是组织培养中最常用的培养基凝固剂。琼脂的一般用量在 0.6% ～1.0%，若浓度太高，培养基会很硬，因而影响培养物对营养物质的吸收；若浓度太低，培养基则因凝固不好而影响操作，起不到支撑作用。琼脂作为一种附加物，并不是培养基的必需成分，实际操作中常根据培养类型的不同而确定是否需要添加琼脂，如细胞悬浮培养及其它液体培养等均不添加琼脂。

⑵ 活性炭　活性炭（activated charcole）为常用的吸附剂。在某些培养类型中，添加一定浓度的活性炭，可以吸附培养过程中产生的一些有毒物质，有利于培养物的生长。活性炭通常的使用浓度为 0.5%左右。需要说明的是，活性炭的吸附作用选择性较差，吸附效果常受温度的影响，温度低时吸附效果好，温度高时吸附能力降低甚至解吸附。

二、培养基配方及培养基选择

1. 常用培养基配方

尽管植物生长所必需的营养物质具有高度的一致性，但不同类型的植物对这些营养成分需求的量则有较大差异。离体培养中，由于外植体不同，因而对营养成分的需求亦不同。因此，前人根据不同培养类型、不同植物营养需求等研究配制了众多符合不同要求的培养基配方。White 培养基（White, 1934）是最早研究的培养基配方，现仍然在许多生根培养中使用。而 MS培养基（Murashing and Skoog, 1962）是目前使用最广泛的植物培养基，是许多不同类型培养基的基本配方。以后又有许多适合不同培养需要的培养基产生。根据这些培养基的无机盐成分和元素的浓度，可将培养基分为以下 4类。

⑴ 富盐平衡培养基　富盐平衡培养基如 MS培养基、LS培养基、BL培养基、BM 培养基和 ER培养基等。其特点是：无机盐浓度较高，元素间的比例适当，离子平衡性好，具有较强的缓冲性，因而在培养过程中可维持较好的稳定性；营养丰富，在一般培养中，无需额外加入复杂的有机成分；微量元素种类全，浓度高。这类培养基是目前使用最广泛的培养基。

⑵ 高硝态氮培养基　高硝态氮培养基代表性配方有 B5培养基、N6培养基及 SH培养基等。这类培养基的特点是：硝酸钾的含量高，氨态氮的含量低，含有较高的盐酸硫胺素（VB_1）。这类培养基比较适合一些要求较高氮素营养，同时氨态氮对其生长又有抑制作用的植物培养。

⑶ 中盐培养基　这类培养基有 H培养基、Nitsch培养基、Miller培养基和 Blaydes培养基。这类培养基大多是在 MS培养基的基础上，根据一些特殊培养中细胞营养需求进行改良的培养基。其特点是：大量元素无机盐约为 MS的一半，微量元素种类减少而含量增高，维生素种类比 MS多，如增加了生物素、叶酸等。

⑷ 低盐培养基　如 White培养基、WS培养基、HE培养基、改良 Nitsch培养基及 HB培养基等。其特点是：无机盐含量低，有机成分含量相对也很低。这类培养基目前多数被作为生根培养基使用。

无论何种培养基配方，除了含有植物生长所需的营养成分外，还必须具有良好的离子平衡特性，培养过程中 pH变化较小，各种离子不会因培养基 pH的轻微变化而改变，这一点，对于 Fe^{2+} 来说更为重要。如 MS培养基中使用 Fe－EDTA螯合铁盐的形式，就是为了避免其它铁盐在培

养基中的不稳定而设计的。表 3.4列出了植物细胞工程研究中最常用的 5种培养基配方。

表 3.4 常用培养基配方 (mg/L)

	White (White, 1963)	MS (Murashige and Skoog, 1962)	B5 (Gamborg et al. 1968)	Nitsch (Nitsch and Nitch, 1969)	N6 朱至清，1974)
无机成分					
KNO_3	80	1 900	2 500	2 000	2 830
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	300	—	—	—	—
NH_4NO_3	—	1 650	—	—	—
$(NH_4)_2SO_4$	—	—	134	—	463
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	720	370	250	250	185
Na_2SO_4	200	—	—	—	—
$CaCl_2$	—	—	—	25	—
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	—	440	150	—	166
KCl	65	—	—	1 500	—
KH_2PO_4	—	170	—	—	400
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	16.5	—	150	250	—
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	—	27.8	—	—	27.8
EDTA钠盐	—	37.3	—	—	37.3
EDTA—Na铁盐	—	—	43	—	—
$Fe_2(SO_4)_3$	2.5	—	—	—	—
$MnSO_4 \cdot H_2O$	—	—	10	—	3.3
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	7	22.3	—	3	—
H_3BO_3	1.5	6.2	3	0.5	1.6
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	3	8.6	2	0.5	0.5
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	—	0.25	0.25	0.025	—
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	—	0.025	0.025	0.025	—
KI	0.75	0.83	0.75	—	0.8
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	—	0.025	0.025	—	—
有机成分					
肌醇	—	100	100	—	—
烟酸	0.5	0.5	1	—	0.5
甘氨酸	3	2	—	—	—
维生素 B_6	0.1	0.5	1	—	0.5
维生素 B_1	0.1	0.1	1	—	1
生物素	—	—	—	0.05	—
半胱氨酸	1	—	10	—	—
pH	5.5	5.8	5.5	5.5	5.8

培养基配方中无机盐浓度通常使用 mg/L或 g/L表示。激素的浓度既使用质量浓度 mg/L,也使用物质的量浓度如 mol/L、mmol/L或 μmol/L。从植物生理学角度考虑,使用物质的量浓度比质量浓度更科学。但由于质量浓度的实际操作更方便,因而被普遍使用。但在进行培养基筛选时,通常需要将质量浓度转换成物质的量浓度,以便于在相同分子浓度上比较。如要将物质的量浓度换算成质量浓度,可按下式计算:

[相对分子质量 ×物质的量浓度 (mol/L)]/1 000=质量浓度 (mg/L)

如要将某一高物质的量浓度的溶液稀释为一低浓度,则稀释量可按下列等式计算:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

式中,M_1 为被稀释的高浓度溶液的物质的量浓度,V_1 为该溶液的体积;M_2 是所需要稀释的物质的量浓度,V_2 为稀释后溶液的体积。V_2 和 V_1 之差即为需要添加的稀释剂的体积。如 V_2 一定,V_1 则为所需要吸取的高浓度溶液的体积。

2. 培养基筛选

培养基的筛选是一个新的培养体系建立初期必不可少的研究环节。对于无机营养成分而言,目前已有许多不同配方的基本培养基可以利用,在一般情况下我们不必考虑建立新的培养基配方,而是在现有培养基配方中选择。参考前人的培养经验,是培养初期培养基配方选择的一条捷径,如 MS是一个广谱性培养基,许多新的培养体系建立可以首先选择 MS作为基本培养基。N6则是为水稻花药培养研究配制的培养基,现被广泛用于单子叶植物的离体培养。豆科作物的起始培养则多选用 B5培养基。

激素的使用浓度常常是一个新培养体系建立时必须进行筛选试验的内容。早在 1948年,Skoog和崔澂首先发现腺嘌呤或腺苷 (adenosine)可以解除培养基中生长素对芽形成的抑制作用,从而诱导烟草的茎切段形成芽,因此确定了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根分化的主要条件之一。这些研究结果导致了以后 KT的发现及利用激动素和生长素控制植物器官分化的研究,由此进一步形成了细胞分裂素与生长素调控离体培养中细胞脱分化与再分化的理论。总体来讲,离体培养中细胞分裂素和生长素的配比原则是:当诱导愈伤组织形成时,细胞分裂素和生长素相对平衡;诱导芽分化时,细胞分裂素水平应高于生长素水平;诱导根发生时则应提高生长素水平。但由于培养物内源细胞分裂素和生长素水平的差异,实际添加到培养基中的激素配比浓度可能在不同培养类型间差异很大,这亦是培养体系建立初期必须进行激素配比试验的重要原因。

有机营养成分的添加则主要根据培养类型考虑,如进行植物器官和组织培养,一般不需添加复杂的有机成分,而进行细胞和原生质体培养则往往需要附加部分或完整的有机营养才能保证培养的成功。

三、培养基配制

1. 培养基母液配制

培养基配方中各种成分的使用量从每升几微克到几千毫克不等,为便于操作和配制浓度的准确,通常将培养基的不同成分先配制成较高浓度的母液,使用时按比例稀释成需要的浓度。无机盐按大量元素、微量元素和铁盐 3部分分别配制。大量元素一般配制成 (10～20) ×母液,微量元素和铁盐则配制成 (100～200) ×母液。有机成分最好单独配制。除肌醇因使用浓度较大

可配制成（100～200）×的母液外，其它有机成分的母液浓度以 1～2 mg/L为宜。配好的母液需贮存于 2～4 ℃的冰箱中，定期检查有无沉淀和微生物污染，如果出现沉淀或微生物污染，则不能使用。培养基母液配制方法以 MS培养基为例列于表 3.5。

表 3.5 MS培养基母液配制

成 分	1 L母液用量／(mg/L)	每升培养基取用量／ml
大量元素 (20×)		
NH_4NO_3	33 000	—
KNO_3	38 000	—
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	8 800	50
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7 400	—
KH_2PO_4	3 400	—
铁盐* (200×)		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5 560	5
$Na_2 \cdot EDTA \cdot 7H_2O$	7 460	—
微量元素 (200×)		
KI	166	—
H_3BO_3	1 240	—
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	4 460	5
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1 720	—
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	50	—
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	5	—
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	5	—
维生素 (200×)		
烟酸	100	—
VB_1	20	5
VB_6	100	—
肌醇 (200×)		
肌醇	20 000	5
甘氨酸 (200×)		
甘氨酸	400	5

* 铁盐的配制方法：分别溶解 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $Na_2 \cdot EDTA \cdot 7H_2O$ 在适当体积的蒸馏水中，适当加热并不停搅拌，待完全溶解后将二者混合在一起，调整 pH至 5.5，最后定容至 1 000 ml。

植物激素使用的浓度很低，因此，一般分别配制成 0.1～1 mg/L浓度的溶液。由于植物激素多不溶于水，另外有些激素在水溶液中不稳定，因此，应根据激素性质确定适宜的母液配制方法。常用激素的配制方法如下。

① IAA 先用少量 95%乙醇使 IAA充分溶解，再加蒸馏水定容至需要浓度的体积。

② NAA 可溶于热水中，也可采用与 IAA同样的方法配制。

③ 2,4－D 先用少量 1 mol/L的 NaOH溶液充分溶解，然后，缓慢加入蒸馏水定容至需要浓度体积。

④ 细胞分裂素类 KT和 BA等细胞分裂素类物质均溶于稀盐酸，应先用少量 1 mol/L的

HCl溶解后再用蒸馏水稀释至需要的浓度。

⑤ 赤霉素　赤霉素的水溶液稳定性较差，一般用 95%的乙醇配制成 5～10 mg/ml的母液低温保存，使用时再稀释。

2. 培养基制备

配制培养基最简单的方法是使用复合配方培养基，目前已有生产厂家根据培养基配方生产的各种复合培养基，只需根据用量称取后加水溶解定容即可。用于动物细胞培养的复合培养基现已广泛使用，但植物培养基目前种类还较少，价格也比较昂贵，因此，植物培养的培养基现仍多采用传统的方法配制，即先根据配方配制各种母液，再制备培养基。

制备培养基时是根据实际需要配制，首先按大量元素、微量元素、铁盐及有机成分的顺序，依次吸取各母液的需要量，加入一适当体积的烧杯或其它配制培养基的容器中，再加入约终体积 2/3～3/4的蒸馏水混匀，然后按每升所用蔗糖的量称取相应量的蔗糖（如 1 L培养基加30 g蔗糖，若只配 0.5 L培养基，则称取 15 g蔗糖）放入培养基中使其溶解。用 1 mol/L的 NaOH或 1mol/L的 HCl调整 pH至 5.8～6.0，再按 0.6% ～0.8%的比例加入琼脂，并搅拌加热，使琼脂完全溶化，然后，用蒸馏水定容至终体积，混合均匀后分装到培养容器内。

培养基是离体培养物赖以生存和生长的人工环境的重要组成部分。除了培养基营养成分本身以外，培养容器、培养基物理状态、pH等均会对培养物的生长产生影响。常用的培养基根据其物理状态不同可分为固态培养基和液态培养基。固态培养基一般使用琼脂为凝固剂，亦有使用卡拉胶或魔芋粉为凝固剂的报道。随着生物材料研究的不断发展，将来可能会有更经济方便的凝固剂以资利用。液态培养基不使用凝固剂，但需要在容器中置入适当的支撑物。以试管为培养容器的支撑物可使用滤纸桥，底面积较大的培养容器，其支撑物可选用脱脂棉以及某些性质稳定的无毒高分子材料等。

培养基制备分装后，应及时灭菌。灭菌后的培养基在室温下冷却后即可使用。如果灭菌后不是立即使用，则应置于 4℃下贮存。贮存室要保持无菌、干燥，以免造成培养基的二次污染。灭菌后的培养基一般应在 2周内使用，贮存时间过长则易造成潜在的污染。此外，培养基灭菌后如果出现过多沉淀或琼脂不凝固等现象时，该培养基不能继续使用，应查明原因重新配制。

第四节　外植体取材及培养条件的控制

一般来说，无论何种类型的细胞工程技术，起始阶段均涉及外植体取材、灭菌、接种与培养等基本过程。本节介绍的即是有关这些过程中，必须考虑的共同问题。至于不同培养类型的特殊细节，将在相应章节中详细讨论。

一、植物材料的培养与外植体取材

外植体（explant）是指用于离体培养的活的植物组织、器官等材料，它是植物离体培养的基础材料。外植体来源的环境以及外植体的类型，均会影响将来培养的效果，而灭菌、接种和培养条件的选择与控制，也与外植体的来源和类型有关。

1. 外植体的来源

用于外植体分离的母体植物材料一般有 3种来源:一是生长在自然环境下的植物;二是有目的地培育在温室控制环境条件下生长的植物;三是无菌环境下已经过离体培养的植物。

自然环境中生长的植物,一般带有微生物,有的甚至与某些微生物具有某种寄生关系,从而使其具有所谓的内生菌。取自这些植物的外植体,尽管经过了严格的灭菌处理,但在培养过程中仍然会有微生物滋生,从而影响培养效果。因此,在大多数情况下,应尽量使用温室或人工气候室控制培养的植物材料作为外植体来源,以减少培养过程中的微生物感染概率。同时,生长在控制条件下的植物可以保持培养材料间的一致性,从而提高实验的可重复性,同时,便于培养技术的规范。然而,某些多年生植物或特殊材料,必须取自自然生长的植物,这就需要尽可能避免使用那些生长在过于潮湿和不洁环境中的植物。对于在培养过程中可能出现内生菌污染的材料,应尽量取生长旺盛期的生长点部位作为起始培养的外植体。

2. 供体植株的管理

对于取自室外的外植体材料,供体植株的管理十分重要,这与外植体培养时的污染率密切相关。在植株管理过程中需要注意的事项如下。

⑴ 避免昆虫为害 因为许多昆虫如蚜虫、螨类和飞虱等是许多植物病害的传播媒介,会引起植物组织的潜在感染。

⑵ 注意防病 尤其是防止真菌和细菌病害的侵染。取自感病植株的外植体,其在培养中的污染率要远远高于来自健康植株的外植体。必要时需使用化学药剂防治病害。

⑶ 控制湿度 给供体植株浇水时应从根部给水,避免从上部浇水,以免植株上部形成易于病原侵染的湿度环境,这一点对于莲座叶类的植物尤为重要。若供体植株生长在温室内,则应尽可能降低温室湿度,减少病害侵染的可能性。取材前应尽可能保持供体植株干爽。

二、外植体灭菌

如果不是取自现成的无菌培养物而是来自温室或田间开放培养的种子、幼苗、器官和组织等,外植体一般均带有微生物,在培养前必须进行严格的消毒处理。常用的植物消毒灭菌剂列于表 3.6。次氯酸盐一般用于一些较软和较幼嫩的组织消毒,消毒时间一般在 5~30 min之间。氯化汞灭菌效果最好,一般用于种子、块根、块茎及较硬的组织的灭菌,但其残留液最难去除,而且对植物组织的伤害亦较大,因此,必须严格控制好消毒时间,一般不超过 10 min,使用浓度为 0.1%~0.2%。同时,氯化汞消毒处理的方法也因植物种类和器官不同而异。所有消毒剂和处理时间及其方法是否得当,不仅影响灭菌效果,同时也影响外植体的生活力,进而影响培养效果。因此,外植体的灭菌处理,必须根据植物材料的性质,确定和优化消毒条件。

表 3.6 几种常用消毒剂的效果比较

消 毒 剂	使用浓度	消毒时间/min	效 果	残液去除难易
次氯酸钙	9%~10%	5~30	好	易
次氯酸钠	2%~5%	5~30	好	易
漂白粉	饱和上清液	5~30	好	易
氯化汞	0.1%~0.2%	2~10	最好	最难
过氧化氢	10%~12%	5~15	较好	最易
抗菌素	4~50 mg/L	30~60	较好	较难

有些植物材料，特别是块茎、块根类植物组织，尽管经过严格消毒灭菌，但经过一定时间的培养后，仍然从其组织内部滋生微生物，这通常是由于内生菌引起的。克服植物组织内生菌对培养的干扰非常困难，目前尚无十分满意的方法。通常的做法是在培养基中加入一定剂量的抗生素以抑制微生物生长，但添加剂量一定要通过试验确定，因为抗生素本身对植物生长是不利的，高浓度下还会造成培养物死亡。

常用的植物外植体灭菌方法简介如下。

1. 种子灭菌

① 将待灭菌种子置于一烧杯或一般玻璃杯中，其体积不要超过容器的三分之一。用一尼龙网或脱脂纱布覆盖杯口，然后将其置于自来水管下冲洗 20min。如果种子特别不洁，可先用加有几滴洗涤剂的水清洗，然后再进行上述操作。

② 种子清洗后，用 70%～75%的乙醇处理 0.5～1min，立即除去乙醇。然后在烧杯中加入消毒剂（可选用表 3.7介绍的任何一种），同时滴 1～2滴吐温 20，将烧杯置于摇床上振荡或搅拌灭菌处理 10～20min，更换一次消毒剂，再灭菌处理 10～20min。

③ 烧杯置于净化工作台上，弃去消毒液，用无菌水清洗 5次，每次 1～2min。

④ 灭菌后的种子用无菌纸吸干水分备用。

2. 芽、叶片、茎等组织材料灭菌

① 选取生长正常、无病虫危害的组织材料，除去多余部分，然后将材料整理成适当的大小放入烧杯中。特别不洁的材料则应先行用自来水冲洗。

② 用 70%～75%的乙醇处理材料 0.5～1min，立即除去乙醇。

③ 然后在烧杯中加入消毒剂（建议使用次氯酸钠或饱和的漂白粉溶液），同时滴 1～2滴吐温 20，将烧杯置于摇床上振荡 10～15min。如果材料污染较严重或组织较老，可适当延长灭菌时间。

④ 将烧杯置于净化工作台上，弃去消毒液，用无菌水清洗 3～4次，每次 1min。

⑤ 灭菌后的材料可置于垫有无菌纸的培养皿中备用。

3. 未成熟胚、子房及花药灭菌

未成熟胚、子房及花药均包被在花器官内，一般可取整个花器官灭菌，然后从灭菌后的花器官中解剖出需要培养的部分。

① 选取适宜时期的花器官，对外植体进行适当整理。如未成熟胚、子房培养的花器官一般花冠已展开，取材后应除去花冠。花药培养的花器官一般为蕾，应除去苞片，保留花冠。

② 将待灭菌材料置于一烧杯中，用 70%～75%的乙醇处理 0.5～1min，立即除去乙醇。

③ 然后在烧杯中加入消毒剂，同时滴 1～2滴吐温 20，烧杯置于摇床上振荡灭菌处理 10～20min，更换一次消毒剂，再灭菌处理 5min。

④ 将烧杯置于净化工作台上，弃去消毒液，用无菌水清洗 5次，每次 1～2min。

⑤ 灭菌后的花器官置于垫有无菌纸的培养皿中备用。

需要注意的是，灭菌后的材料应立即接种培养，否则会造成二次感染。对于茎芽、花等组织材料，灭菌后若不立即接种培养，会影响其生活力，甚至不能培养成功。灭菌处理完成后，从进入净化工作台操作开始，操作人员必须严格按无菌操作规则完成以后的步骤，否则会造成外植体污染。

三、接种培养及其培养条件的控制

外植体灭菌后,立即置于无菌操作台上进入无菌操作程序。从事无菌操作的人员,必须首先进行必要的清洁和消毒,包括更换工作服、洗手以及手和操作工具的消毒。外植体接种前,应根据外植体的类型和培养需要,将外植体分割成适当的大小,以便于培养。外植体的分割一般是置于灭菌过的培养皿或专门的器皿中进行,分割前需用无菌纸吸干多余水分。分割外植体可使用医用解剖刀,要保持刀片锋利,切割时刀片和外植体互成直角,水平拉动刀片以保证切口整齐。分割后的外植体应立即接种,以防失水。接种时可根据外植体类型确定方向,如茎尖生长点应使生长点顶端朝上,其它组织切片可水平放置,但必须注意切口与培养基充分接触,以便于培养基的吸收。接种完成后应尽快将接种材料置于适当的培养条件下进行培养。由于不同的植物种类对自然生态条件的要求差异很大,因此,其适宜的离体培养条件也不尽相同,需根据不同的植物类型和离体培养类型确定培养条件。通常所说的培养条件主要包括光照、温度、培养基 pH 和培养环境的空气流通程度等。

1. 光照

离体培养的光照调节包括光照强度、时间和光质的控制等。光照调节通常是分阶段进行的。培养初期,对于大多数培养类型来讲只需要散射光或弱光照,因为光照过强常常抑制培养初期外植体的增殖。这一方面是因为强光照抑制外植体周缘细胞的分裂,使外植体的启动时间推迟;另一方面是在光照下外植体伤口迅速褐化,从而影响增殖,有时甚至导致培养物死亡。当外植体细胞启动分裂后或进入分化培养阶段,则需要根据植物类型增强光照。因此,外植体的培养初期和在愈伤组织增殖阶段,一般在黑暗条件下或在弱光照下培养比较好。在器官分化阶段,高强度的光照是必要的。许多试验证明,愈伤组织只有在光照条件下才能变绿并进而分化器官。

光照的控制还与培养目的有关,有些培养类型,如特殊器官诱导等,常常需要合适的光周期和适宜的光源。目前,光照培养室使用的光源基本上是荧光灯管,光照强度的调节大多通过增减单位培养面积的灯管数进行。光照时间的调节则可通过自动定时装置实现自动控制。

光质对细胞分裂的影响似乎受一些培养基成分的控制,如维生素等。光质对器官分化的影响大于对细胞分裂的影响。如光谱中主要是蓝色光对诱导烟草愈伤组织成苗起作用。在蓝光下形成的苗发育正常,而在黑暗条件下只能形成细芽,不能进一步发育成苗,在红光和远红光下则不能形成苗(汪纪方等,1981)。在马铃薯试管块茎形成过程中也观察到,蓝色光有利于试管块茎形成,而红色光则抑制块茎形成(Aksenova 等,1989)。光质对于器官发生的影响还可能与植物种类、器官类型等有关。因为,在有些植物中,红光及远红光有促进器官形成的功能,光质对于器官形成的影响可能受光敏色素所调节。

2. 温度

在组织培养中,温度不仅影响细胞的增殖和分化,同时在一些特殊培养中常常还需要采用不同的温度处理。植物组织培养常用的温度范围一般在 20~30℃,低于 15℃或高于 35℃均会影响培养物的生长。在具体培养中,温度的设置必须根据植物类型来确定,如马铃薯一般采用 20℃,柑橘采用 27℃,棉花则采用 30℃。在大多数情况下,适宜的温度有利于细胞分裂,即可以提高细胞分裂速率;而适当提高温度,则有利于细胞伸长。在一定范围内降低培养温度,可能使细胞分裂和生长速度均减缓,而使细胞的质量增加。这可能是在低温下细胞代谢降低,消耗减

少,从而使内含物积累增加的缘故。但温度过低会导致生长停止,有时也会导致愈伤组织褐化,表 3.7显示了温度对菊芋愈伤组织细胞生长的影响。

表 3.7　温度对菊芋愈伤组织细胞生长的影响

培养温度/℃	接种时单个细胞平均鲜重/μg	到指数生长期末单个细胞重/μg
10.0	0.44	0.20
15.0	0.42	0.12
25.0	0.44	0.07
30.0	0.42	0.06
32.0	0.52	0.03

(引自王纪方等,1981)

温度的调节还与培养类型有关。一般来讲,组织、器官的培养温度控制可粗放一些,而细胞、原生质体培养温度的控制则要精细。值得注意的是,在可以忍耐的温度范围内,高温对培养物的影响比低温要严重得多。

3. 培养基 pH

植物离体培养时培养基的 pH使用范围一般在 5.5～6.0,pH在 4.0以下或 7.0以上培养物就不能正常生长。在培养过程中,由于培养物对各种成分的吸收并不是同步和相同的,另外,培养物本身的代谢产物亦会不断释放到培养基中,这些均会使培养基的 pH发生改变。如番茄离体根的培养,当使用以硝态氮为单一氮源的 White培养基时,随着根的生长,NO_3^- 被大量吸收,在 7 d内 pH从最初的 5.2升高到 6.2。当以铵盐为单一氮源时,由于根对 NH_4^+ 的吸收会使 pH向酸性方向递减。因此,现在一般使用多种含氮无机盐作为氮源,以免引起培养基在培养过程中 pH变化过大而对培养物产生危害。

另一个引起 pH变化的原因就是高温灭菌。经过高温灭菌后,培养基的 pH一般要下降 0.2个单位左右。梁海曼 (1987)的研究显示,单成分溶液因高压灭菌所引起的 pH变化幅度要比复合培养基大得多。同时,器皿质量对培养基 pH的影响也不容忽视。当使用钠玻璃器皿时,高压灭菌后的培养基,pH有时会升高 1个单位以上 (江曼丽等,1986)。

由于复合培养基成分具有一定的缓冲调节能力,一般培养基高压灭菌后经过 1～2 d的贮存 pH会有一定程度的回复。如 N6培养基附加 0.7 mol/L蔗糖,灭菌前的 pH调整值为 5.85,高压灭菌后 pH下降至 5.10,贮存 48 h后测定,其 pH又回复到 6.05 (梁海曼,1987)。

综合考虑各种因素,在培养基配制时,一般将培养基的 pH调整在 5.6～6.0的范围之间,具体则应根据培养物对 pH的要求而定,但大多数植物以调整为 5.8比较适中。对于某些培养类型来讲,要求 pH有较好的稳定性,如细胞培养,原生质体培养等,这时要使用一些缓冲剂。

4. 气体调节

培养室的透气程度和培养容器的封闭程度均会影响培养过程中的气体交换,进而影响培养物的生长状态。培养物的生长需要氧气。在进行固体培养时,如果组织完全浸入培养基中,与空气隔绝,生长就会停止。因此,一定要有部分组织和空气接触。如果瓶塞封闭到完全不通气时,培养物也不能生长。所以增加可利用的氧,迅速除去组织呼吸释放出来的有害气体,有利于外植

体外层细胞的分裂启动和培养物的继续生长。

培养器皿的封闭性主要与封口方式和材料有关。比较早的培养器皿多为三角瓶或试管,封口多用脱脂棉塞和牛皮纸,其透气性好。但由于脱脂棉吸潮后易引起微生物污染,现一般采用聚乙烯薄膜封口,其透气性与捆扎松紧度有关。还有些专门生产封口膜的厂家,在双层薄膜之间夹入特殊材料的透气膜,以改善通气条件。此外,目前已进入市场的许多高分子材料器皿,在设计时均考虑了透气性,使用起来比较方便。

在进行液体培养时,振荡培养是常用的改善通气条件的培养方式。研究表明,培养物的生长量与振荡的频率有关。在一定的振荡次数范围内,由于通气状况的改善,细胞生长量随着振荡次数的增加而增加。振荡频率超过一定的范围后,细胞的生长量则会逐步降低。通气改善后,培养液中的溶解氧的浓度会显著增加,而溶解氧的浓度还会影响培养物的分化方式。Steward等(1958)及 Halperin(1966)在胡萝卜细胞悬浮培养中看到存在有两种再生小植株,一种先形成根后再长出小植株,一种则经胚状体成苗。Kessel及 Carr(1972)发现这种现象与液体培养基中存在的溶解氧的浓度有关。当培养基中的氧浓度低于临界水平时,有利于形成胚状体。而氧浓度高于临界水平,则利于形成根。这一结果与 White早年推测的氧在调节器官发生中可能有重要作用的观点是一致的。在一些变态器官形成的离体培养中,通气性亦显得十分必要,如马铃薯试管块茎形成中,通气条件严重影响块茎的大小和生理状态。

对于大多数的实验室,培养室一般是全封闭性的。如果培养室面积小,培养量相对较小,其通气状况一般不会影响培养物的生长。但对批量化大规模培养而言,在培养室建设时应该考虑空气的适当交换,否则会影响培养物的生长状态。在实验中通常可以观察到,当培养室定期通风,保持有新鲜清洁的空气进入培养室时,其培养物生长势强,生长速度快。而封闭性好,没有空气流通的培养室,其培养物生长往往较弱,试管苗叶片变小变薄。但需要注意的是,培养室的空气流通一定要注意清洁和干燥,否则不洁空气的进入反而会造成培养物的污染。某些特殊实验室和有条件的实验室,可考虑使用层流设备进行培养室的气体交换调节。

思考题

1. 植物细胞工程实验室的基本组成与要求。
2. 培养基的组成成分有哪几类,在离体培养中的功能是什么?
3. 植物离体培养的环境条件及对培养的影响。

第四章

植物组织和器官培养

植物细胞工程的中心内容实质上就是植物细胞、组织和器官的培养。从技术上说它是一种从单细胞到植株的无性繁殖技术。从遗传的角度来讲,这一技术具有双重性:一是遗传的保守性,二是遗传的变异性。根据研究目的的不同,我们可以从技术上对二者进行选择和控制,从而使这一技术更好地为人类服务。利用其保守性,我们可以进行植物脱毒和快速繁殖、保存植物种质资源、建立生物反应器生产具有经济价值的次生代谢物等。利用其变异性,我们可以进行体细胞诱变以筛选符合育种目标的突变体,并进行体细胞杂交以克服远缘有性杂交的障碍。由于单细胞培养与组织和器官培养在技术上具有较大差异,本章首先介绍植物主要的组织和器官培养技术。

第一节　植物脱毒与快速繁殖

一、植物脱毒和快速繁殖的意义

1. 植物脱毒和快速繁殖的概念

生长在自然环境条件下的植物往往受到许多病原生物的侵染,其中病毒病可以通过繁殖材料尤其是无性繁殖材料进行积累和世代间的传播,造成品种退化(degeneration)。植物脱毒(virus elimination)就是利用植物组织培养技术,脱除植物细胞中侵染的病毒,生产健康的繁殖材料。

许多植物尤其是无性繁殖植物,在自然条件下的繁殖系数低,阻碍了推广应用速度。离体的快速繁殖就是利用细胞的再生特性,在组织培养条件下加速繁殖材料的个体生产,提高繁殖系数。以植物组织培养技术发展为基础的植物脱毒和快速繁殖技术,已广泛地应用于农业生产,并产生了显著的经济效益和社会效益。

2. 植物脱毒和快速繁殖的意义

(1) 能够有效保持优良品种特性

农业生产的首要目的就是要提高产量,增进品质。这一目的是通过两种途径来实现的,即选育高产优质品种和采用适宜的耕作栽培技术。任何一个优良品种均需要有一个忠实地保存其遗传性状的繁殖方法。在自然繁殖条件下,植物的繁殖方式有两种:一是有性繁殖(sexual propagation),二是无性繁殖(clonal propagation)。有性繁殖对于自交作物是有效的,但对于异交作物来讲,如果没有特殊的技术措施,则不能很好地保持品种的特性。而离体无性繁殖主要是以植物营养器官为外植体,繁殖过程在人工控制的环境条件下,所以既不会造成性状分离,同时还避免了病虫害的侵染,从而可以很好地保持品种的优良特性。

⑵ 生产无病毒种苗,防止品种退化

近年来,由于设施农业的迅速发展,提高了复种指数和土地利用率,但因植物的周年生长,寄主及病原媒介的密度增加,导致病害问题日趋严重,其中尤以病毒病最难控制。特别是对那些无性繁殖的植物来讲,病毒病为害更为突出。据 Phatak1974年报道,现在已知的植物病毒已超过了 600种,其中至少有 80种可以通过种子传播。病毒对于无性繁殖植物如薯类、甘蔗、花卉、林木及果树等的危害尤甚,因为无性繁殖的植物感染病毒后,可由无性繁殖器官不断传播蔓延,其结果使该植物发生退化,甚至导致该植物品种灭绝。

据统计,能感染草莓的病毒有 62种,柑橘至少有 15种,马铃薯有 26种。目前受病毒为害严重的作物有:

① 大田作物 马铃薯、甘薯、甘蔗和烟草。

② 蔬菜 白菜、大蒜、葱、番茄和萝卜。

③ 果树 柑橘、苹果、草莓和香蕉。

④ 花卉 香石竹、各种菊花、天竺葵和紫罗兰等。

传统的病毒防治方法可分为三大类:物理方法、化学方法和生物学方法。物理的方法很多,如采用 X射线、紫外线、超短波和高温等对繁殖材料进行处理,使病毒钝化,从而达到抑制病毒蔓延的目的,在生产中可以收到一定效果。在物理因子中,以热处理效果较好,且易于操作。早在 1889年,爪哇人就采用热水浸泡甘蔗种的方法来防治当时未知的一种病害(后证明为病毒病)。热处理的原理是利用病害和寄主对高温的忍耐性的差异,在植物受到高温伤害前或伤害较小时杀死病毒或使病毒活性有效钝化。这种方法现在已与组织培养技术相结合,用于植物脱毒,但单独使用热处理脱除病毒的效果并不明显。

化学方法是采用一些抑制剂如孔雀绿、硫尿嘧啶、8-氮鸟嘌呤和病毒唑等,干扰病毒在植物体内的复制,达到防治病毒病的目的。但这些化学药剂多数属于干扰素类,它们或为代谢抑制剂如病毒唑,或为广谱抗体等。由于病毒为非细胞生物,它的一切代谢活动均需在植物细胞中进行,所以可以说,凡是抗病毒的药物对植物细胞本身的副作用都是很大的,要么效果不佳,要么影响植物自身代谢活动。到目前为止,还没有一种能有效抑制病毒的药剂和药剂防治方法。

生物学方法主要有使用抗病毒品种和采用种子繁殖两种。植物感染病毒常常是复合侵染,即同时感染好几种病毒。而抗病育种往往只能针对某一种或少数几种病毒进行,因此,即使是选出了抗某一种病毒的品种也很难兼抗各种病毒。另一方面,育种常需要十多年的周期,品种在选育和繁殖过程中常常因感染病毒而夭折。虽然种子繁殖可以剔除某些病毒,但仍有许多病毒可以通过种子传播,如马铃薯 X病毒(PVX)、S病毒(PVS)等。还有能引起退化的类病毒(viroid)如马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)等也通过种子传播。因此,种子繁殖并不能完全达到防止退化的目的。同时,对大部分无性繁殖植物来讲,有性繁殖往往会带来遗传分离,从而使种性丧失。

由于病毒在植物体内的分布具有不均匀性,因而通过分生组织培养,采取适当的措施,就可以获得脱毒植株。再采用组织培养方法繁殖脱毒苗用于生产,就能使病毒病害得到有效的控制。事实上,组织培养的基本环节都属于无菌操作。因此,所生产的无毒苗不仅剔除了病毒,同时也不带任何真菌、细菌病害,是真正意义上的健康种苗。

⑶ 快速繁殖新品种,加速优良品种推广

传统的无性繁殖方法,繁殖系数很低,一般在 1:10。木本植物如果树、林木、花卉等甚至更

低。往往一个新品种出来以后，要经过许多年才能推广到一定面积，使得某些易感染病毒病的品种甚至还没能应用就夭折，常常有人说推广的速度还没有退化的速度快。而离体繁殖因为周期短（1～3个月），不受季节限制，因此繁殖系数高（几十至几百倍），其繁殖速度是任何其它方法所不能比拟的，所以通常将组织培养繁殖称之为快繁（rapid clonal propagation）。这就大大地加快了优良品种的推广速度。

事实上，脱毒—保持种性—快繁这已是一个系统技术，在许多无性繁殖作物的种苗生产上均形成了自己的体系。

⑷ 节约耕地，提高农产品商品产出率

对于那些以块根、块茎、鳞茎为繁殖器官的作物来讲，每年相当一部分产品要用作留种。如：

① 大蒜　留种量占产量的 1/5～1/8。

② 马铃薯　留种量占产量的 1/10。

③ 贝母　留种量占产量的 1/3。

这就是说，每种 5亩大蒜要 1亩地的种蒜田；每 10亩马铃薯要有 1亩种薯田；每 3亩贝母就要 1亩种子田。这既占用了大量的耕地，又减少了实际收入。采用离体繁殖，则在不增加任何投入的情况下实际增加了产出率。

⑸ 便于运输

常规的营养繁殖器官多是块根、块茎、鳞茎、枝条等，体积大、含水量高，包装、运输十分不便，特别是远距离调运损失很大。而离体繁殖的种苗体积小，一般自带容器，很易携带，运输方便。以马铃薯为例来讲，按 1亩地 4 000株计算，常规种薯 4 000个重约 200 kg（每个平均 50 g），若用试管薯 4 000个则只有 2 kg（每个 0.5 g）。

二、植物脱毒的原理和技术

1. 基本原理

早在 1934年，White发现烟草花叶病毒（TMV）在烟草根中的分布是不均匀的，越靠根尖（root tip）区病毒含量越低，在根尖的顶端（生长点）不含病毒（White, 1934a）。到 1949年，Limasset和 Cornuet根据 White的发现推测，病毒在烟草茎中的分布也可能存在与根部组织同样的情况，茎尖分生组织（apical meristem）也应不带病毒。后来的研究证实，根尖和茎尖分生组织并不是完全没有病毒。1952年，Morel和 Martin首先利用茎尖分生组织培养获得了大丽花和马铃薯无病毒苗，同时建立了茎尖脱毒的组织培养技术体系。

最近，Ayabe和 Sumi（2001）报道利用大蒜茎片生长点（stem-disc dome）培养脱除病毒的方法。外植体为取自大蒜鳞茎片培养所形成的具有生长点式结构的组织，通过诱导这种组织成苗，获得了无病毒的大蒜植株。

病毒在植物体内分布不均匀性的机理目前还不十分清楚，但根据病毒及分生组织的特性，学者们提出了一些假说，主要有以下几种。

① 能量竞争　病毒核酸和植物细胞分裂时，DNA合成均需要消耗大量的能量。分生组织细胞本身很活跃，其 DNA合成是自我提供能量、自我复制。而病毒核酸的合成要靠植物提供的能量来实现自我复制，这就产生了细胞分裂与病毒复制对能量的竞争。病毒可能得不到足够的能量来进行核酸复制，所以导致在分生组织中没有病毒或病毒含量低。而分生组织以下的细胞分

裂不活跃,主要是生长,因此病毒可以在这些细胞中获得足够的能量用于复制(Quak, 1966)。

② 传导抑制 Quak(1966)还提出了另一种解释。他认为病毒在植物体内的传播主要是通过维管束实现的,但在分生组织中,胞间连丝(plasmadesmata)和维管组织还不健全,可能抑制了病毒粒子(virion)向分生组织的传导。

③ 激素抑制 在分生组织中,生长素和细胞分裂素水平均很高,因而阻滞了病毒的侵入,或者这种高水平的激素浓度抑制了病毒活性(Quak, 1977),但这一假说还没有充分的事实证明。

④ 酶缺乏 Stace-Smith于1969年提出了酶缺乏机制的推测,他认为病毒合成可能需要酶的参与,但在分生组织中缺乏或还没建立起病毒复制所需的酶系统,因而病毒无法在分生组织中复制。这种说法亦尚待证明。

⑤ 抑制因子 Martin-Tanguy等于1976年提出了抑制因子假说,认为在分生组织中病毒含量低是因为分生组织自然地存在某种抑制因子,这种抑制因子也可能是有性繁殖种子通常不带病毒的原因。这种解释也还没有直接的证据。

尽管上述假设还需要进一步研究证实,但在植物分生组织中不带或很少带有病毒的发现,为植物脱毒和利用组织培养技术快速繁殖健康种苗开创了新途径。

2. 植物脱毒的技术规程

脱除病毒是植物组织培养繁殖的第一个重要步骤,是下步繁殖材料是否健康的保证,已广泛应用于马铃薯、柑橘、甘蔗、香蕉和花卉等植物的健康种苗生产。虽然各种植物在脱毒技术的细节上有些差异,但大体上均要经过病毒类型诊断、脱毒母体材料选择与预处理、茎尖分生组织分离与培养、病毒检测、脱毒植株保存和快繁等几个基本环节(图4.1)。

(1) 被脱毒植物携带病毒的诊断

在脱毒之前,首先应了解该植物携带何种病毒,其感染程度如何,以便在以后的环节中采取适当的处理措施。这种诊断一般根据病毒病的症状特征和表现程度进行判断,必要时可借助指示植物(indicator plant)或血清学(secology)、分子生物学方法帮助鉴别。

(2) 母体材料的选择和预处理

母体材料指的是提供脱毒用外植体的植株或其某一器官。母体材料的选择是根据植物本身的特性及感染程度来进行的。首先,我们应选择的是欲脱毒材料的品种典型性,即准备用于脱毒的外植体材料一定要来自于具有该品种典型性的植株。这一点是十分重要的,因为它直接关系到脱毒以后的脱毒苗是否保持原品种的特征特性。其次,是要对外植体的健康程度进行选择。一般来讲,需要脱毒的植株或多或少带有病毒,但带病的程度是不同的。我们应选取感病轻、带毒量少的植株作为脱毒的外植体材料,这样更容易获得脱毒株。

由于无性繁殖植物的繁殖器官不同,在选择母体材料上也各有差异。以块根、块茎为繁殖器官的无性繁殖植物,首先,应选择繁殖器官具有品种典型性的块根或块茎作为基础脱毒材料,其体积为中等大小,应发芽正常,无纤细芽或丛芽。以茎芽为繁殖器官的无性繁殖植物,应在生长旺盛季节选择生长正常的顶芽作为脱毒的外植体材料。对于多年生的果树、林木等植物,应选择生长基本正常的树,在春天抽梢期选择正常的健壮芽作为脱毒的外植体材料。

预处理是提高脱毒效率的辅助措施。一般采用热处理,分干热和湿热两种。湿热处理一般只适应于一些木本植物的休眠芽,其处理温度和时间的控制要非常严格,否则会影响芽的生命活

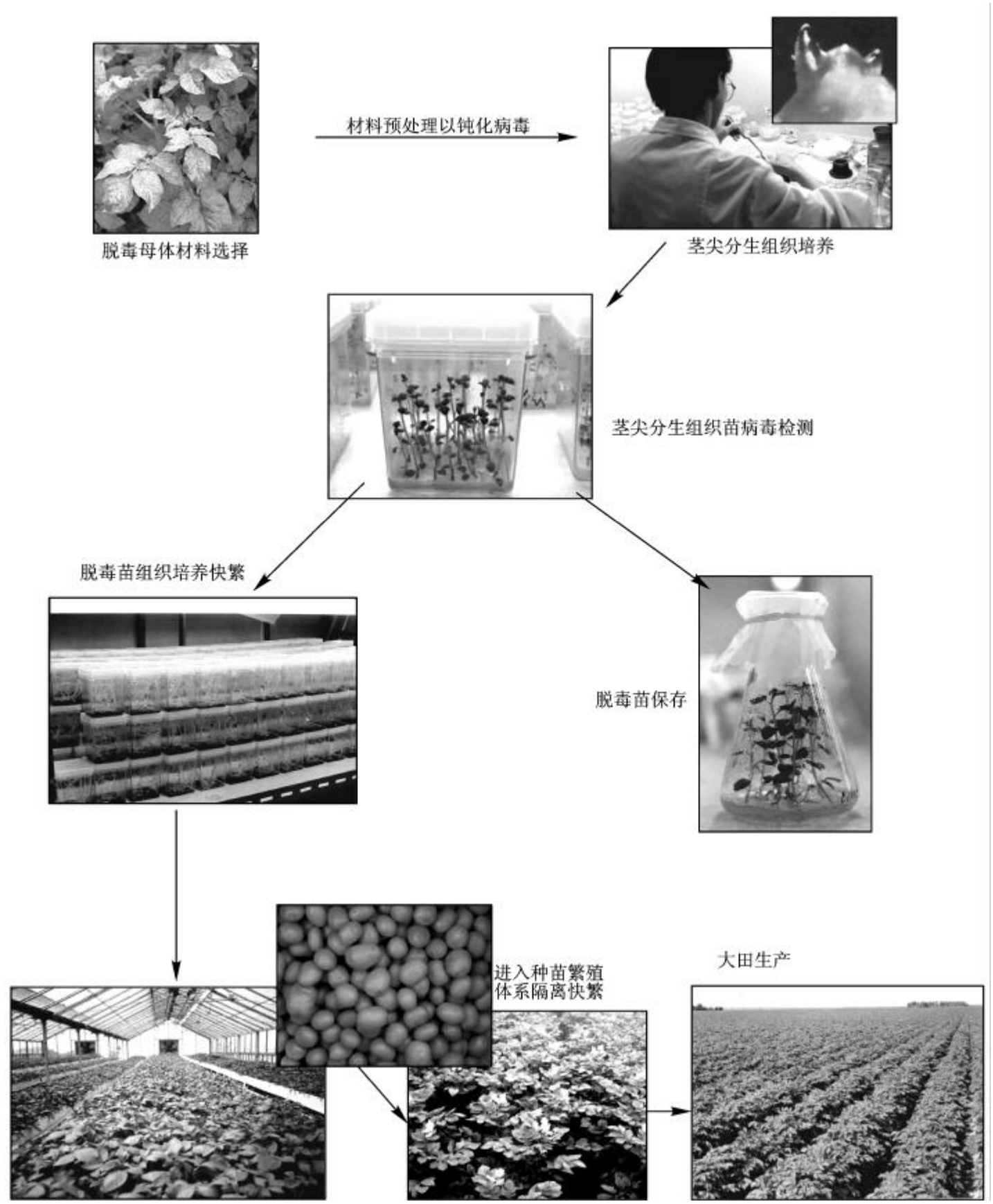


图 4.1　以马铃薯为例示植物脱毒快繁的基本程序

性。其它植物材料在实际中使用最多的是干热处理，处理温度一般在 50℃以下，根据植物的耐热性和病毒的失活温度而定。下面介绍几种主要植物常用的热处理方法。

① 香石竹　在 38～40℃条件下经两个月处理可除去全部病毒。

② 菊花 在35～38℃的条件下处理60 d可使病毒失活。

③ 马铃薯 在37℃条件下处理10～20 d能除去卷叶病毒。

④ 柑橘 速衰病毒、黄化病毒需要在40℃/30℃条件下处理7～12周。鳞皮病毒需要在40℃/30℃条件下处理8周。碎叶病毒需要在50℃条件下处理3～22 h。亚洲青果病毒在50℃条件下处理30～40 min。

⑶ 茎尖分生组织培养再生植株

茎尖分生组织培养的基本过程是:外植体消毒—茎尖剥离—茎尖培养。在这一系列的程序中,茎尖的剥离是分生组织培养成功与否的关键。首先用于茎尖剥离的外植体必须清洁,剥离任何可能去掉的叶片,然后浸入70%的酒精溶液中除去可能附着的空气,再按第二章介绍的方法进行外植体灭菌。

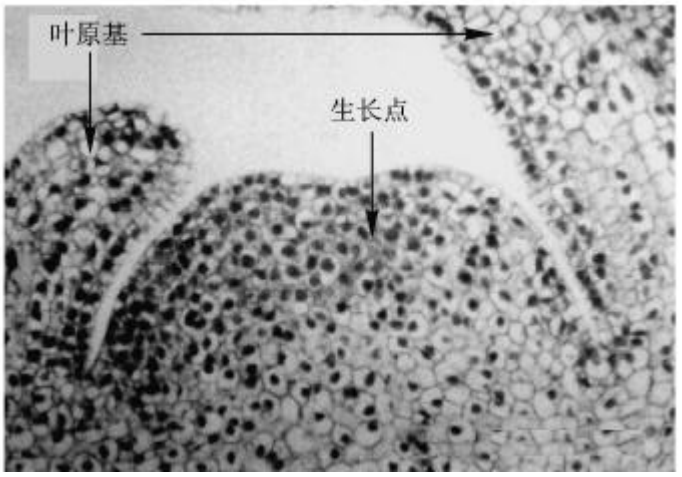


图4.2 大蒜茎尖分生组织,示叶原基和生长点

利用茎尖分生组织作为外植体脱毒的效果较好,但不带叶原基(leaf primodia)的茎尖分生组织则成苗困难,而分离过大的茎尖分生组织(带有多个叶原基)又会对脱毒效果产生不利影响,这需要根据不同的植物、外植体类型、病毒种类和外植体取材时间来确定适宜的分生组织大小。植物分生组织以大蒜为例示于图4.2。

分生组织培养形成植株后,经过生根就可以移栽。在组织培养条件下,再生植株的生根难易往往是组织培养技术能否应用的关键。所以,在茎尖培养中,常根据生根难易采取不同的措施,有时甚至要改变培养方法。一般有以下3种情况。

① 很易生根 在茎尖培养基上可以直接生根,如马铃薯、甘薯等。

② 较易生根 需转入专门的生根培养基上生根,如甘蔗、香蕉和大多数花卉植物等。

③ 很难生根 对于大多数木本植物来讲,生根常常是组培繁殖的一大难题,因而需要从根本上改变培养方式。最有效的方法是微芽嫁接(micrograft)。

⑷ 脱毒效果检测

尽管我们已经采取了一系列措施剔除病毒,但这并不能说我们所得到的茎尖苗全部不带病毒。因此,脱毒效果的检测是十分必要的。一般来讲,再生植株后,一般应在18个月以内进行病毒鉴定,因为病毒在植物体内的潜伏期一般在6～12个月以上。病毒鉴定的方法主要有指示植物鉴定(indicator plant test)和血清学鉴定(serological test)。所谓指示植物是指具有能够辨别某种病毒的专化性症状的寄主植物。将待测植物的汁液(sap)接种到指示植物上,如果被测植株带毒,则指示植物上会出现特定症状。如果没有症状出现,则可以说明被测植株已剔除了某种病毒。常用的指示植物有千日红、曼陀罗和心叶烟等。有时不同病毒在同一种指示植物上出现相似的症状,这时就要用一套指示植物来鉴定。如番茄环状花叶病毒和烟草环斑花叶病毒在曼陀罗上均表现为局部坏死斑,这时就要再用千日红鉴定。番茄环状花叶病毒在千日红上呈系统花叶,而烟草环斑花叶病毒在千日红上仍表现局部坏死病斑。指示植物鉴定常常不能定量而只能

定性,同时由于受接种方式、发病条件的影响,使鉴定结果出现一些误差。

很久以前人们就发现,生过某种传染病的动物,以后很少再受同种传染病害的侵染,因为这些动物已经有了对这种病害特异的免疫力(immunity)。这种免疫性反应有一个共同的基础,即称之为抗原(antigen)的物质刺激该动物在体内产生所谓抗体(antibody)的蛋白质。抗原与所诱导产生的抗体之间有着专化性反应,从而保护该种动物不再受同种病毒的侵染,这就是免疫反应(immunology reaction)。抗原与抗体的专化性反应可以在体内进行,也可以在体外进行,因此这一反应就可以应用于病毒的研究工作中。由于抗体存在于动物的血清(serum)中,因此,用体外抗原和血清中的抗体所进行的结合反应称为血清学反应。但在植物病毒研究中,血清学是作为一种手段和方法,一般对植物体内病毒并无直接的免疫作用,这和动物机体的免疫反应有着不同的含义。1927年 Dvorak首先将这一方法应用于植物病毒的研究。现在这一方法已广泛应用于植物病毒的各种研究中。用于脱毒检测的血清学方法如下。

① 试管沉淀反应　这是应用最早、最广泛、也是最简单直观的方法。一般是在抗原-抗体最适比例的条件下,观察有无沉淀产生来确定被测植株是否带病毒。试管沉淀反应虽操作简单,但需注意几个问题:其一是叶绿体的自发凝聚(可用磷酸缓冲液提取汁液,再用氯仿处理除去叶绿体,pH保持在6.5～8.5的范围内);其二是抗原抗体的比例要适当,当抗原过量时会抑制沉淀的形成。

② 免疫双扩散　这是在半固体的凝胶(如琼脂、明胶等)中测定在其中扩散的抗原和抗体间的沉淀反应的方法。与沉淀法比较起来它有两个显著优点:一是节约血清;二是汁液勿需特殊处理。因此,这一方法现已被广泛用于植物脱毒的血清学鉴定。免疫双扩散的基本步骤包括:倒胶(铺板),一般2mm厚;打孔,多打成梅花形;封底,要求薄匀;加样,加血清和汁液。一般加样后在37℃下恒温过夜,即可进行结果观察。有扩散沉淀的即为带毒株,没有沉淀的为不带毒株。

③ 酶联免疫吸附测定(ensyme-linked immunosorbent assay, ELISA)　它是将抗原、抗体的免疫反应和酶的高效催化反应有机结合而发展起来的一种综合性技术。即通过化学的方法将酶与抗体或抗原结合起来,形成酶标记物。这些酶标记物仍保持其免疫活性,然后将它与相应的抗原或抗体起反应,形成酶标记的免疫复合物。结合在免疫复合物的酶,在遇到相应的底物时,催化无色底物生成有色产物,通过比色计可以准确测定。由于它的终反应测定是酶反应,所以又称之为酶标法。其优点是灵敏度高,测定快速,每次可以同时测定多个样品,测定效率高。

目前用于病毒检测的还有汁液提取染色(detection of viruses directly on sap extracts)、免疫吸附电镜(immunosorbent electron microscopy)、病毒粒子修饰("decoration" of virion)等电镜检测技术和核酸杂交(nucleic acid hybridization, NAH)、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)等分子检测技术。

(5) 脱毒苗的保存与繁殖

通过病毒检测证明不带病毒的植株就可以用来进行保存和繁殖生产。脱毒苗的保存和繁殖根据植物的生活习性以及生产力水平可以采取不同的方法。脱毒苗的保存一般由科研单位或有条件的种子生产部门进行,作为组织培养繁殖的最基础的材料。对于脱毒苗的繁殖生产来讲,则需要与所脱毒植物的供种体系相适应,大体上有以下一些环节:

① 脱毒苗的离体保存与繁殖　这一环节一般是在实验室进行,在试管中不断继代繁殖脱毒苗,这样可以彻底防止病毒的再侵染。

② 建立脱毒种苗生产繁殖网络体系 试管脱毒苗可以直接供应大田生产,但在有些情况下,如出现试管苗生产成本过高、移栽困难等问题时,往往首先将试管苗选择种植在一定的控制区域内,从繁殖技术和环境隔离上均保证较高水平,使得繁殖的种苗能有效地防止病毒的再侵染,由此再提供大田生产用种苗。

③ 木本植物建立隔离的脱毒苗母本园 有些木本植物在试管中继代成本高,且移栽成活率低,而以嫁接繁殖为主要繁殖方式,此时就要选择隔离条件较好的区域建立脱毒母本园以供采集接穗。

3. 影响脱毒效果的因素

⑴ 母体材料病毒侵染的程度

试验证明,只被单一病毒感染的植株脱毒较容易,而复合侵染的植株脱毒较难。马铃薯脱毒试验表明,在只被 PVX 感染的植株中,茎尖分生组织培养产生的 42株植株中有 34株是无病毒的,但在 PVX、PLRV 复合侵染时,茎尖分生组织培养获得的 34株植株中只有 2株是无病毒的。

⑵ 起始培养的茎尖大小

茎尖脱毒时所剥离的茎尖大小直接影响脱毒效果。一般取不带叶原基的生长点培养脱毒效果最好,带 1~2个叶原基的茎尖培养大约可获得 40%左右的脱毒苗,而带 3个以上叶原基的茎尖培养一般获得脱毒苗的频率就大大降低 (表 4.1)。

表 4.1 茎尖大小对马铃薯脱毒效果的影响

茎尖大小/mm	叶原基数	成苗数	脱毒株数	脱毒率/%
0.12	1	50	24	48.0
0.27	2	42	18	42.9
0.60	4	64	0	0

⑶ 外植体的生理状态

一般来讲,顶芽的脱毒效果比侧芽好,生长旺盛季节的芽为外植体脱毒比休眠芽或快进入休眠的芽的脱毒效果好。

需要说明的是,脱毒植株并不具有额外的抗病性,它有可能再度感染病毒。病毒的再侵染常常是脱毒苗应用中影响其效果的一个因素,所以要严格控制脱毒种苗的生产环境,在实际生产中还应重视更新基础苗。草本植物的基础苗一般 1~2年更换一次。木本植物则需逐步建立健康果园,剔除感染源,适时更换基础苗。

三、离体繁殖

离体繁殖 (propagation in vitro) 是在人工控制的无菌条件下,使植物在人工培养基上繁殖的技术。跟常规的繁殖方法相比,它是一种微型操作过程,因此,有时也称之为微繁 (micropropagation)。离体繁殖技术的应用,首先应归功于 Morel,他在 1960年首先建立了兰花离体繁殖的方法。自此以后,随着组培技术的不断发展和成熟,这一技术很快在其它植物上也得到了应用。据不完全统计,目前已有近 400种植物的离体繁殖已获得成功,其中许多具有重要经济价值的花卉 (如兰花、菊花、石竹等)、水果 (如草莓、无籽西瓜、葡萄、草莓和香蕉等)、经济作物 (如马铃薯、甘蔗等) 和林木 (如桉树、杨树等) 等,均已建立离体繁殖的种苗生产体系,取得了巨大的经济效益和社会效益。

1. 离体繁殖的一般技术

离体繁殖根据繁殖程序可以划分为 4个环节:无菌培养物的建立,培养物的增殖,器官分化,植株的形成和移栽。

⑴ 无菌培养物的建立

与其它所有类型的组织培养技术一样,离体繁殖首先必须建立相应的无菌培养物。其程序包括外植体的选择、外植体灭菌、接种和培养等基本过程。

外植体的选择主要应考虑以下 3个方面的问题。

其一,植物在自然条件下的繁殖特点。同是无性繁殖植物,但它们的繁殖器官有很大差异,有的以枝条扦插繁殖,有的为块根块茎繁殖,有的以芽繁殖。在选择外植体时应充分了解所要繁殖的植物的繁殖特点,尽可能取自然繁殖器官的适当部位作外植体,这样有利于起始无菌培养物的建立。

其二,离体条件下茎芽的增殖方式。在进行离体培养之前,应根据植物的繁殖特点,确定在培养中以何种形式作为培养物的增殖方式。如有些植物在培养条件下苗的生长与自然条件下类似,可以以顶芽和侧芽直接长成小植株,我们一般就可以考虑选择顶芽作为外植体。但大多数植物常常先形成不定芽,然后通过生根培养才能最后形成小植株,在这种情况下,我们应考虑何种器官培养更易产生不定芽。如非洲紫罗兰、大岩桐及各种秋海棠等以叶片为外植体易产生不定芽,而百合、水仙、大蒜和贝母等则以鳞茎为外植体更易产生不定芽。

其三,外植体的取材部位、大小和生理状态。确定用何种器官进行培养以后,还应考虑取一个植株上的那一部位的器官适宜。一般来讲,以靠近植株顶端的幼嫩器官培养较易成功。而过于老化的组织器官,由于细胞脱分化困难,培养则较难成功。对于那些以块根、块茎、鳞茎为外植体的植物,应在这些器官形成的初期取材,老化的块根、块茎或鳞茎会增加培养的难度。外植体的大小一般要根据具体情况而定,但总的来说并不是越大越好,其大小应该适宜。对于块根、块茎等还应考虑切取的部位应带有形成层,如果切取的部位全部为髓部组织则培养不易成功。

⑵ 培养物的增殖

培养物的增殖是离体繁殖技术最重要的环节,它的成功与否直接关系到所建立的无菌培养物系统能不能应用于苗木生产。由于植物的种类和自然生长习性不同,其增殖方式及所采取的相应技术措施也不一样。一般来讲,培养物的增殖有以下 4种方式。

① 芽增殖　高等植物的每一叶腋中通常都存在有腋芽,在适宜的条件下每一个腋芽均可以长成一个新的枝条或小植株,这就是自然条件下扦插繁殖的基础。在离体培养下,加入适当浓度的细胞分裂素,或去除顶端不加任何激素,即可使腋芽伸长或长成芽丛,经过反复的切割即可得到大量的芽,再经过生根培养就可以生产出大量的试管苗。芽增殖方式的特点主要表现在培养方法简单,能高度保持遗传稳定性,能长期继代繁殖。目前采用这一方式快速繁殖的植物有石竹、马铃薯、甘薯、草莓、葡萄和月季等。这一繁殖方式一般不需要添加外源激素。如果某些植物需要使用激素,一定要严格控制浓度,以防止产生愈伤组织。

② 不定芽增殖　从现存的芽以外的任何器官和组织上通过器官发生重新形成的芽称之为不定芽(adventitious buds)。在自然条件下,许多植物的器官可以产生不定芽,如苹果、醋栗的根,风信子的鳞片,秋海棠和非洲紫罗兰的叶片等。在组织培养条件下,可以使这种能力极好地得到发挥。非洲紫罗兰用常规叶插法,每片叶只能产生几个或十几个芽,但在组培条件下可一次形成几十至几百

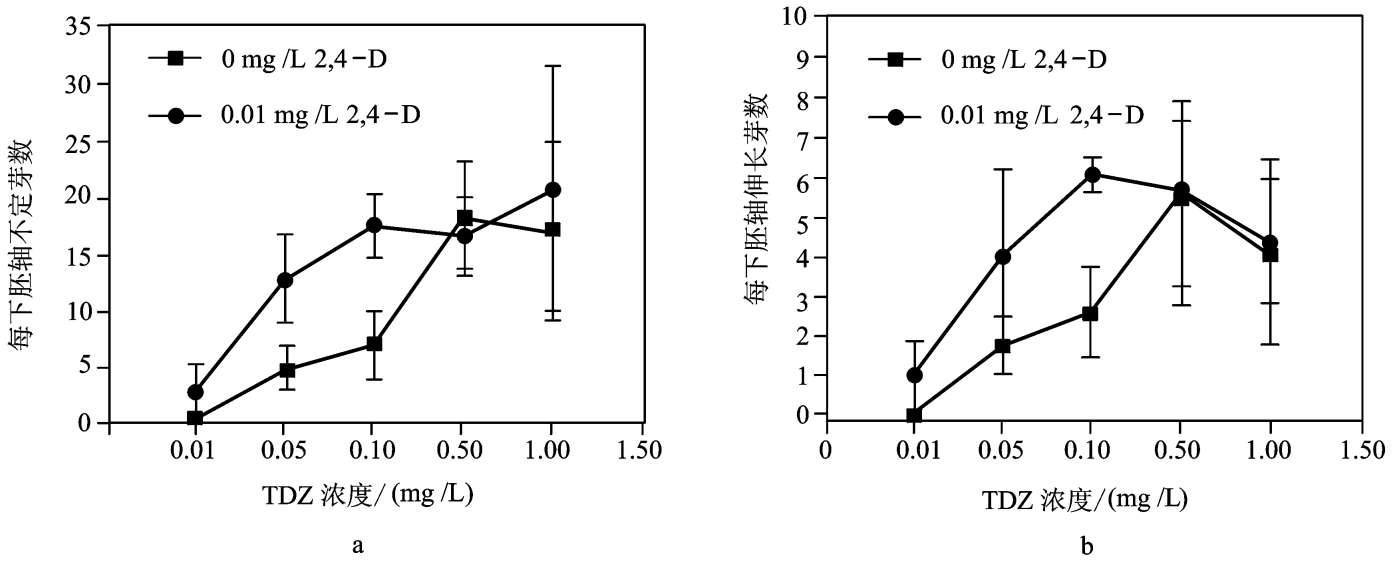


图 4.3 胶皮枫香树下胚轴培养中生长素 2,4-D和具有细胞分裂素活性的 TDZ浓度对不定芽形成数 (a) 和伸长芽数 (b) 的影响
(引自 Kim等,1997)

个芽,一年可以培养成上千个小植株。此外,在组培条件下还能使通常不产生不定芽的植物或器官形成不定芽,如甘蓝、番茄等。

诱导不定芽一般需要同时加入外源生长素和细胞分裂素,二者的配比一般是细胞分裂素要略高于生长素,以免产生过多的愈伤组织。Kim等 (1997) 在胶皮枫香树 (Liquidambar styraciflua) 子叶下胚轴培养中使用了不同浓度的生长素 2,4-D和具有促进细胞分裂活性的 TDZ,发现培养基附加 0.01mg/L 2,4-D和 1mg/L TDZ的不定芽诱导率最高,而附加 0.01mg/L 2,4-D和 0.1 mg/L TDZ的培养基更有利于芽的生长 (图 4.3)。生长素和细胞分裂素的使用浓度应尽可能低,以保证繁殖品种的遗传稳定性。目前采用不定芽繁殖的植物较多,如紫罗兰、兰花和香蕉等。不定芽增殖方式的特点主要表现在繁殖系数高,有较好的遗传稳定性。需要注意的是,诱导不定芽增殖的激素浓度不能过高,培养物继代一定次数以后,当不定芽形成减弱时要重新建立无菌培养物。此外,不定芽一般需要进行生根培养才能形成真正的植株。

③ 胚状体增殖 在自然界只有少数植物 (如云香科) 可以由珠心细胞产生珠心胚,可算是自然的胚状体。在组培条件下现已有 30多个科、150多种植物可以产生胚状体。在诱导胚状体形成时一般使用胚、分生组织或生殖器官作为外植体。培养基需含有丰富的还原态氮和适宜的生长素 (2,4-D) 浓度。胚状体形成后,要及时转移到低浓度或不含生长素的培养基中让胚状体成熟。胚状体增殖方式的特点是增长率高,胚的双极性免去了生根环节,但胚状体休眠的诱导和解除还难以把握,其成苗率还不高。因此,目前除一些特殊用途外 (人工种子),这一技术途径还没有用于植物的快速繁殖。

④ 愈伤组织增殖 可以说,所有的植物通过组织培养的方法均可以诱导形成愈伤组织 (callus),愈伤组织再进一步分化即可获得小植株。这一途径经历了组织培养技术的所有过程,即从愈伤组织诱导、愈伤组织增殖、芽分化、根分化到形成完整植株。它属于真正意义上的组织培养。一切通过其它增殖方式不能成功的植物,均可以通过愈伤组织的途径获得组培苗。愈伤组织增殖的特点是成功率高,繁殖系数大,但遗传稳定性较差。对要求遗传稳定性高的作物品种,一般不采用这一途径快繁。但有些植物如花卉往往要求有丰富的变异,还有些植物,即使产生变异但

并不影响其商品价值和经济效益。这些植物就适于采用愈伤组织增殖的途径来进行种苗繁殖。

⑶ 生根培养

对于上述途径所获得的芽,在大多数情况下均需要转移到生根培养基中进行生根诱导,并进一步发育成完整植株。生根培养基一般要求降低矿物营养的浓度,提高生长素的浓度,具体应根据植物种类而定。

⑷ 生产用苗的培植

试管苗可直接用于大田生产,但对土壤、水肥和气候的要求严格,否则易造成移栽成活率低、难以培植壮苗等问题。因此,在多数情况下,试管苗需要经过一些缓冲过程以后再用于生产。就一般程序讲,试管苗应通过炼苗、假植和定植等过程,以提高试管苗对自然环境条件的适应性。不同的植物种类所采取的方式也有较大差异,应根据植物的生长发育特性和实际环境条件选择适宜的生产用苗培植方法。

2. 离体繁殖的使用范围

虽然离体繁殖有许多优越之处,但在实际应用中应根据技术成熟程度、经济基础及必要性来确定其应用范围。目前,离体繁殖常用于以下几个方面:某些难以繁殖或繁殖系数很低的植物,或某些需要加速繁殖的特殊基因型如名贵花卉、优良资源、果树芽变体和转基因植株等,或自然无性繁殖极易感染病毒的植物如马铃薯、甘薯、甘蔗、香蕉、石竹和百合等,或有性繁殖变异范围过大而自然条件下又不易无性繁殖的植物如非洲菊、花竹和紫罗兰等。

3. 离体繁殖的遗传变异与控制

⑴ 外源生长调节剂对品种典型性的影响

严格地讲,以快速繁殖优良品种为目的的离体繁殖技术应该避免使用外源生长调节剂,因为任何外源生长调节物质都有可能引起品种性状的变异。在实际操作中,特别是某些培养反应较差的植物或其内源激素浓度很低的植物,在没有外源生长物质存在时往往很难培养成功,此时应严格控制使用浓度,尽可能地使用低浓度生长调节剂。同时,要对试管苗进行田间性状观察,如果发现变异率过大时,则应重新选择具有品种典型性的个体更换起始培养物。

⑵ 继代次数与变异

据有关研究,继代次数越多,其变异的概率就越大,特别是那些在增殖过程中仍然要使用外源激素的植物。因此,建立的无菌培养物要根据情况定期更换,减少继代次数,以降低遗传变异发生的概率。

⑶ 增殖方式的合理选择

由于增殖方式对遗传变异的影响较大,在离体繁殖中,首先选择的增殖方式是茎芽增殖,其次是不定芽。除非万不得已,不宜选择愈伤组织增殖方式。总之,增殖方式的选择应综合考虑有利于品种的遗传稳定性和生产的可能性。

第二节　花药及花粉培养

一、基本概念

1. 花药培养

花药培养（anther culture）是指把发育到一定阶段的花药接种在人工培养基上，使其发育和分化成为植株的过程。花药培养的外植体是植物雄性生殖器官的一部分。实际上，由此再生的小植株，多数是由花药内处于一定发育阶段的花粉发育而来的。经过减数分裂后的小孢子（microspore）所形成的花粉，可以看作是处于特定阶段的雄性生殖细胞。因而，花药培养亦可以看作为广义的花粉培养或孤雄生殖（androgenesis）。但是，就培养方法和技术来讲，花药培养所采用的外植体属于植物的雄性器官。因此，从培养类型上来讲，花药培养仍然属于器官培养的范畴。

自从 1964年 Guha等首次报道从毛曼陀罗（Datura innoxia）的花药培养获得了单倍体植株之后，许多植物的花药培养相继取得了成功。20世纪 60年代末至 70年代初，花药培养的研究工作发展十分迅速。据不完全统计，目前已有 23个科，52个属的 250多种高等植物的花药培养获得了成功（胡道芬，1996）。

我国在花药培养技术和应用方面居于世界先进行列。据 Chu（1982）的统计，至少有 32种谷类作物、蔬菜类和木本植物的花药培养再生植株由我国学者在国际上首先培育成功。其中包括小麦、玉米、大豆、小黑麦、高粱、油菜、辣椒、甜菜、白菜、青菜、甘蔗、柑橘、橡胶和杨树等重要的农作物和经济作物。利用花药培养技术，我国研究人员还培育出了一大批具有研究和应用价值的烟草、水稻、小麦、大麦、玉米和辣椒等的新品系（种），其中水稻新品系（种）有 100多个，累计推广面积近 91万 hm^2（胡道芬，1996）。

2. 花粉培养

花粉培养（pollen culture）又叫小孢子培养（microspore culture），是从花药中分离出花粉粒，使之成为分散的或游离的状态，通过培养使花粉粒脱分化，进而发育成完整植株的过程。

从雄配子（male gamete）发育的角度来讲，花粉首先是由小孢子母细胞（microspore mother cell）经减数分裂（meiosis）产生 4个一群的单倍体细胞，这个发育时期称为四分体（tetrad）。四分体中的每个单倍体细胞逐渐释放出来，形成单个的花粉粒。在雄配子这一系列的发育过程中，我们把四分体时期到四分体刚刚解体成单细胞这一阶段的单倍体细胞称之为小孢子。小孢子继续发育，其核进行第一次分裂后形成 1个精核（generative nucleus）和 1个营养核（vegetative nucleus）的二核细胞。营养核再分裂 1次就形成 1个精核和 2个营养核的三核细胞。我们把这种二核或三核的雄性细胞称为花粉。在花粉培养过程中，通常是取花粉发育处于单核期或双核早期阶段的花粉细胞进行培养。因此，有时花粉培养也称为小孢子培养。从培养方法和技术方面来讲，花粉培养采用花粉细胞为外植体，因此它属于细胞培养的范畴。由于花粉培养和花药培养在研究目的和实验技术上相近，从减少重复的目的出发，本书将花粉培养与花药培养归于一节介绍。

花粉培养的研究工作始于 1953年，Tulecke培养银杏的花粉得到了愈伤组织。后来一些研究者分别将红豆杉、麻黄和日本榧树（Torreya nucifera）等裸子植物的花粉培养得到了愈伤组织。Nitsch等（1973）采用花药预培养的方法首次获得了烟草和曼陀罗的花粉植株。此后，天仙子、马铃薯、颠茄、矮牵牛、茄子、水稻、小麦、大麦、玉米、蔓青和大豆等植物的花粉培养也相继获得成功，得到了花粉植株（卫志明，1998）。

花药培养和花粉培养是获得植物单倍体的有效方法之一。与花药培养相比，花粉培养可以避免花药壁、花丝和药隔等体细胞组织的干扰，因此能更好地调节控制雄核发育的各种因子，并且花粉数量大，具有单细胞、单倍性和较高同步性等特点，从而可以从较少的花药获得大量的花

粉植株。同时还能为研究细胞分化条件、胚胎发生和形态发生机理提供较为理想的实验系统。花粉培养的成功为深入开展花粉原生质体的培养、遗传操作和发育分子生物学等的研究提供了有用的材料和良好的技术基础。

3. 单倍体

所谓单倍体是指具有配子体（gametophyte）染色体数的孢子体（植物个体）（sporophyte）。这里单倍体的概念与遗传上一倍体的概念是不同的。一倍体（monoploid）是指只含有一个染色体组的个体。对于孢子体染色体组数为 2的真正二倍体（diploid）植物来讲，单倍体就是一倍体。但在很多情况下二者是不同的，这取决于植物的染色体倍性水平。如四倍体植物产生的单倍体其染色体有 2套，实际上是二倍体。比如马铃薯栽培种 Solanum tuberosum是四倍体（tetraploid），染色体倍性为 2n=4x，其单倍体植株的染色体倍性则为 2n=2x。同理，八倍体（octoploid）植物产生的单倍体实际上是一个四倍体，如草莓的花粉植株。为了避免概念上的混淆，我们把来源于同一植物，具有该植物配子体染色体数的孢子体统称为单倍体。在由四倍体植物产生的单倍体中，常常使用双单倍体（dihaploid）的概念。现在由于遗传研究的需要，为了建立永久性的分离群体，有些二倍体植物常常通过花药培养获得单倍体，然后加倍，这种加倍后的单倍体也称为双单倍体，如水稻等。这些概念要根据具体内容加以区别，以免混淆。

单倍体植物与它们的二倍体相比较，有 3个明显的特点：一是体细胞染色体数减半；二是生长发育弱，体形小，各种器官明显减小；三是雌雄配子严重败育，有的甚至不能进入有性世代。由此可以看出，单倍体常常不能直接利用。然而，单倍体在植物育种、植物生物技术等重要研究领域却具有十分广阔的应用潜力，这也是人们不断研究它的根本原因。

二、花药培养

1. 外植体的选择

花药外植体选择是否适宜，直接关系到培养能否成功，在选择外植体时要考虑材料的遗传背景、生理状态及花粉发育时期等有关因素。

⑴ 供试材料的遗传背景　目前，通过花药培养成功获得单倍体植株最多的是茄科植物，其次是十字花科、禾本科和百合科等。即使是在这些植物中，不同植物类型和同一类型的不同品种对花药培养的反应也是不同的。在马铃薯中，我们曾经用来自 tuberosum种的 80多个品种进行花药培养试验，其中只有 12个品种被启动，而真正获得单倍体植株的只有两个品种。据研究，烟草花药是较易诱导的材料，但是，“朗氏烟草”则很难诱导花药植株。水稻中粳稻比籼稻容易诱导，其植株分化比例分别为 40%～50%和 1%～2%。

⑵ 供试材料的生理状态　在多年生植物中，幼年植株比老龄植株的花药诱导频率高。草本植物生长健壮、且处于生殖生长高峰期的花药诱导频率较高，而徒长或营养不足的植株花药培养的诱导频率则较低。

⑶ 花粉的发育时期　在花药培养中，花粉的发育时期对于培养的成功与否是至关重要的。对于大多数植物来讲，适宜的培养时期是单核中晚期到双核早期。

就具体的植物而言，花药培养的取材时期并不完全相同，如番茄以减数分裂期的幼嫩花药为好，而芸苔属植物的某些材料则以花粉成熟时的花药为好。这可能是由于不同植物的花粉终端分化临界期不同的缘故。

在花药培养中,如果每次取材时都要进行花药发育时期观察是很不方便的,一般是在试验之前,对花粉的发育时期和其相对直观的生长发育特点进行相关研究,通过直观的对应性状来确定花粉发育时期,如花粉发育时期与花药大小、花蕾大小、花冠展开程度等的关系,然后根据花冠、花蕾大小,判断花粉发育时期。如柑橘在花冠露白时大多数花药处于单核晚期,马铃薯在花冠露出鄂片一半时大多数花粉处于单核晚期,烟草则在花冠露出 1/3～1/2时为花药培养的最佳时期。

2. 材料的表面消毒

挑选出适宜培养的花蕾或幼穗以后,选用一种适当的消毒方法对材料进行表面消毒。一般先将花蕾或幼穗的表面用 70%乙醇浸泡 1 min,然后在饱和漂白粉溶液中浸泡 10～15 min,也可用 15%次氯酸钠溶液浸泡 10～15 min,或 0.1%氯化汞溶液消毒 3～5 min,或用 1∶100倍的 84消毒液浸泡 15～20 min,最后用无菌水冲洗 3～5次,以彻底清除残留在材料表面上的药液。如果花蕾包裹严密,内部一般是无菌的,只要用 70%乙醇的棉球对叶鞘或花蕾进行表面擦拭即可达到消毒的目的。

3. 接种

将消毒过的材料置于超净工作台上,无菌剥取花药进行接种。在剥取花药时,应注意在整个操作过程中尽可能地避免花药受到损伤,否则常常会刺激花药壁形成愈伤组织。如果是花药较大的材料,可用解剖刀或镊子剥开花蕾,用镊子夹住花丝,取出花药。如果是花器很小的植物,如天门冬属、芸苔属和三叶草属植物等,可能需要借助解剖镜夹取花药,或只把花被去掉,将其余部分接种在培养基上。接种时尽量减少花药在空气中的暴露时间,将花药水平地放在培养基上进行培养。花药的接种密度因培养方式而异。若为固体培养,50～100 ml的三角瓶一般每瓶接种 10～20个花药,9 cm的平皿一般接种 20～40个花药。若为液体培养,一般 10 ml液体培养基中接种 50个左右的花药。

在花药培养中,使用的基本培养基一般随植物种类不同而异,但总的来说以 MS培养基应用最为普遍。MS、White (White, 1963)、Nitsch (Nitsch, 1969) 和 N6 (朱至青等, 1975) 培养基比较适合于茄属作物;B5 (Gamborg等, 1968) 培养基较适合于芸苔属及豆科植物;B5、N6和马铃薯 -2 (Chuang等, 1978) 培养基较适合于禾谷类植物。另外,根据花药培养的特殊要求,一些研究者还研制出了特异的培养基,如适合于小麦的 C17 (王培等, 1986) 和 W14 (欧阳俊闻等, 1988) 培养基,适合于水稻的 SK3 (陈英等, 1978) 和通用培养基 (杨学荣等, 1980),适合于玉米的正 14 (母秋华等, 1980) 和玉培 (谷明光等, 1978) 培养基,适合于大麦的 FHG培养基 (Hunter, 1988) 等。这些培养基的研制成功,大大地提高了花药培养的效率。其中由我国学者研制的 N6培养基被广泛地用于水稻、小麦、大麦、小黑麦、玉米和甘蔗等植物的花药培养,取得了很好的效果。植物花药培养常用的培养基及其组成列于表 4.2。

4. 培养

花药培养一般在温度 24～28 ℃、光照 1 000～2 000 lx、光周期 14 h的条件下进行培养。对于不同的植物,其最适的培养条件会有所不同,应加以研究分别确定。

5. 植株再生

花粉植株可通过两种途径再生:一是由花粉诱导形成的胚状体途径,二是花粉愈伤组织途径。当离体花药在培养基上培养一段时间之后,在对培养发生反应的花药中,花药壁组织逐渐变

表 4.2　花药培养常用的一些培养基成分（单位 mg/L）

成分	培养基							
	C17	W14	SK3	FHG	通用*	玉培	正 14	马铃薯 −2**
KNO_3	1 400	2 000	2 830	1 900	3 000	2 500	3 000	1 000
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	—	—	—	—	—	—	—	100
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	—	—	—	—	—	—	—	—
$NH_4H_2PO_4$	—	380	—	—	400	—	—	—
NH_4NO_3	300	—	—	165	—	165	—	—
$(NH_4)_2SO_4$	—	—	315	—	—	—	150	100
KH_2PO_4	400	—	640	170	—	510	600	200
KCl	—	—	—	—	—	—	—	35
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	150	200	280	370	185	370	450	125
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150	140	166	440	166	176	150	—
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85	27.8	55.5	—	27.8	13.9	27.8	27.8
Na_2EDTA	37.25	37.3	74.5	—	37.3	18.7	37.3	37.3
$Na_2FeEDTA$	—	—	—	40	—	—	—	—
K_2SO_4	—	700	—	—	—	—	—	—
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	11.2	—	4.4	22.3	4.0	4.4	—	—
$MnSO_4 \cdot H_2O$	—	8.0	—	—	—	—	10.0	—
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6	3.0	1.5	8.6	1.5	1.5	2.0	—
H_3BO_3	6.2	3.0	1.6	6.2	1.6	1.6	3.0	—
KI	0.83	0.5	0.8	0.83	0.8	0.8	0.75	—
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	—	0.005	—	0.25	0.25	—	0.25	—
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	0.025	—	0.025	0.025	—	0.025	—
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	0.025	—	0.025	0.025	—	0.025	—
甘氨酸	2.0	2.0	10.0	—	2.0	2.0	2.0	—
盐酸硫胺素	1.0	2.0	0.5	0.4	1.0	1.0	10.0	1.0
盐酸吡哆醇	0.5	0.5	0.5	—	0.5	0.5	1.0	—
D−生物素	1.5	—	—	—	—	—	—	—
烟酸	0.5	0.5	2.5	—	0.5	0.5	1.0	—
肌醇	—	—	—	100	—	—	100	—
水解酪蛋白	—	—	—	—	—	—	500	—
水解乳蛋白	—	—	—	—	300	—	—	—
脱氧单核苷酸	—	—	—	—	20～25	—	—	—
谷氨酰胺	—	—	—	730	—	—	—	—
麦芽糖	—	—	—	62 000	—	—	—	—
Ficoll−400	—	—	—	200 000	—	—	—	—
蔗糖	90 000	110 000	60 000	—	50 000	120 000	150 000	90 000
琼脂	7 000	5 000	7 500	—	7 000	8 000	8 000	5 500
pH	5.8	6.0	5.8	5.6	5.8	5.8	5.8	6.0

＊ 通用培养基的 pH 为 5.6～6.0。

＊＊ 马铃薯 −2培养基含有 10%马铃薯块茎提取液。

褐。培养 3～8周后,由于花粉愈伤组织或花粉植株不断生长所造成的压力,药壁破裂,从而形成肉眼可见的愈伤组织或花粉小植株。当愈伤组织长到直径 2～3 mm时,转移到分化培养基上继续培养。对于大多数植物而言,在分化培养基上培养 10～20 d后,即可出现芽的分化,然后在芽的基部长出不定根,有时在芽的基部不能分化出不定根。

6. 生根和移栽

由花药培养再生的小植株,往往茎叶细弱、根系不发达,并且通过愈伤组织途径再生的芽,有些不能分化出不定根,因此很难直接移栽成活。当花粉植株长到 3～5 cm高时需将其转移到生根壮苗培养基上,促进根系的发育和壮苗。双子叶植物可转移到附加 0.1～0.5 mg/L IBA的 MS培养基上生根壮苗。禾谷类作物的幼苗可转移到 N6 (朱自清等,1975) 基本培养基上形成大量不定根,从而有利于幼苗的移栽成活。

将花粉植株由试管移栽到土壤中时,先用水轻轻地洗掉沾在根上的琼脂培养基,然后移栽到盆中或苗床上。最初的 10～15 d盖上塑料杯或塑料薄膜,以保持一定的湿度。在塑料罩上可打些小孔,用于气体的交换。在保湿数天之后,可除去覆盖物,进行正常的栽培管理。

三、花粉及小孢子培养

1. 取材时期的确定

与花药培养相比,花粉及小孢子的取材时期应更早一些。严格地说,花粉和小孢子并没有本质的区别,一般习惯上把处于四分体到单核早期的花粉称为小孢子。进入单核以后则称其为花粉。花粉和小孢子培养的取材适宜期大多为花粉发育处于四分体到单核早期的材料。

2. 花粉的分离

⑴ 机械分离法

将花药置于盛有少量液体培养基或与培养基等渗的蔗糖溶液的培养皿中,用平头的玻璃棒或注射器内管轻轻挤压花药,使其散出花粉。将得到的花粉残渣和花粉的混合液通过一定孔径的不锈钢筛或尼龙网过滤。孔径大小根据不同植物花粉粒的大小选择,一般孔径应比花粉粒直径大 10 μm左右,太大花粉残渣容易漏过去,太小花粉过滤不下去。大块药壁残渣被留在网上,收集含有花粉和小块药壁残渣的滤液到离心管中,于 500～1 000 r/m离心 1～5 min,花粉粒沉淀,小块药壁残渣悬浮在上清液中,弃去上清液。再加入液体培养基或蔗糖溶液,使花粉悬浮,然后离心弃去上清液。重复 2～3次,最后再用液体培养基离心纯化 1次。加入花粉液体培养基,用血球计数器计数调整密度后进行培养,接种密度一般为 10^4～10^5 个/mL。此方法的优点是操作简便,缺点是花粉中会混杂有体细胞。该方法对双子叶植物较为适用,但对禾谷类作物不太适用,并且容易损伤花粉粒。

⑵ 花药漂浮培养自然释放法

将经过一定时间低温预处理的花药,接种于液体培养基中,培养一定天数后,花药开裂,释放出花粉粒。定期将花药转移到新鲜培养基中,再释放花粉,继续收集。为了提高分离效果,可置于摇床上低速振荡。花粉粒释放后,用血球计数器调整密度后进行培养。此方法操作简便有效,可以连续收集花粉,并且对花粉无损伤,但分离出花粉的数量相对较少。

⑶ 磁拌法

将花药接种于含有液体培养基的三角瓶中,然后放入一根磁棒,置于磁力搅拌器上,低速转

至花药呈透明状。为了提高分离速度,在培养基中可加入几颗玻璃珠。此方法分离花粉比较彻底,但对花粉有不同程度的机械损伤。

3. 花粉培养方法

⑴ 直接培养

直接培养是指从不经预培养或预处理的新鲜花药中直接分离出花粉粒,接种到培养基中进行培养的方法。在 20世纪 80年代以前,用这种方法只能诱导某些裸子植物如银杏、红豆杉和麻黄等的花粉形成愈伤组织,但一直未见形成再生植株的报道。直到 1982年才由普通烟草的花粉直接培养,通过胚状体途径获得了再生植株。此后,曼陀罗、黄花烟草、大麦、蔓青、水稻和芸苔属一些种的花药不经预培养而相继获得了再生植株。

不经花药预培养,但在培养基中添加花药提取物后,再接种花粉进行培养使烟草、曼陀罗和大麦的花粉培养获得了再生植株。花药提取物的制备方法是先将花药接种于合适的培养基上培养一周,然后取出花药浸入刚煮沸的水中,每毫升水中加入 10个花药,倒入研钵内研碎之后转入离心管中,高速离心后的上清液即为花药提取物。花药提取物过滤灭菌后加入到花粉培养基中,加入的量随植物的种而异,对于烟草或曼陀罗,每毫升培养基 5或 10个花药,大麦 20个花药。

⑵ 预培养

将花药在液体培养基中先漂浮培养 2～4 d,在 5 ml液体培养基中可培养约 50个花药。然后挤出花粉,经离心洗涤纯化后悬浮于液体培养基中进行培养,密度可调整为 10^4～10^5 个/ml。此方法首先在曼陀罗和烟草上获得了成功,后来在天仙子、马铃薯、颠茄、矮牵牛、茄子、水稻、大麦、玉米和小麦上都相继获得了成功。

⑶ 哺育培养

将在合适培养基上培养裂开的花药作为一种哺育组织,这种花药可以是同一种植物的,也可以是另一种植物的,但其花药培养的诱导频率必须是比较高的。将欲培养的花粉接种到这种花药里进行哺育培养。利用该方法能够使矮牵牛花药中的烟草花粉被诱导而再生植株。

⑷ 看护培养

Sharp等 (1972)用看护培养的方法培养番茄的离体花粉粒,成功地获得了单倍体愈伤组织,其基本过程如图 4.4。先将番茄的完整花药水平放于半固体培养基表面,然后在花药上面覆盖一张滤纸小圆片,吸取 0.5ml约含 10个花粉粒的悬浮液滴在滤纸小圆片上。对照实验是去掉花药而直接将滤纸小圆片放在培养基上,其它操作完全相同。在 25℃光下培养,结果花粉在看

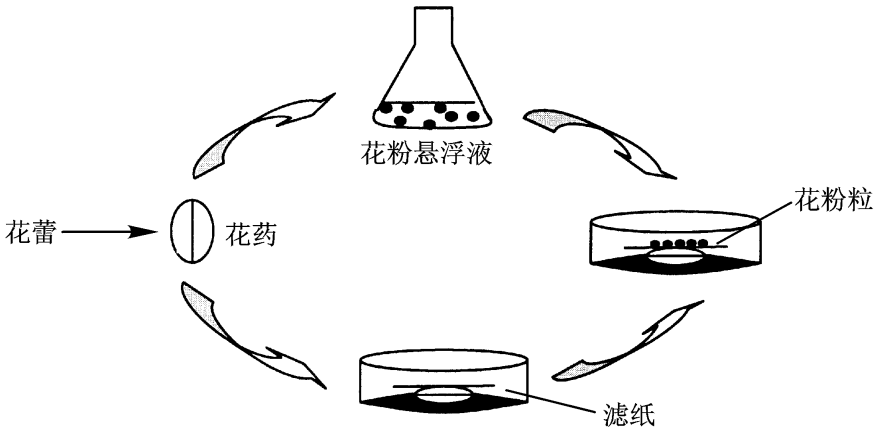


图 4.4　花粉看护培养法示意图

护培养的滤纸片上长出了由绿色薄壁细胞组成的细胞群落,植板效率最高可达 60%,而无花药看护的对照花粉则完全不生长。通过这种花药看护培养法得到的无性系都是单倍体。

⑸ 微室培养

用滴管取 1滴悬浮有花粉的液体培养基,滴在盖玻片上,然后翻过来放在一凹穴载玻片上,盖玻片四周用石蜡密封。这种方法的优点是便于在整个培养过程中进行连续的活体观察,可以把一个细胞生长、分裂和形成细胞团的全过程记录下来。缺点是培养基太少,水分容易蒸发,使培养基中的养分和 pH容易发生变化,影响花粉细胞的进一步发育。用该方法已诱导甘蓝花粉启动分裂形成多细胞团,但未能继续发育。

⑹ 双层培养

这是我们在马铃薯花粉培养中试验的方法。其花粉悬液的制备与上述悬浮培养相同,只是培养方式采用了固相和液相双层培养。固体培养基采用与花药培养相同的培养基配方,每 100 ml培养基附加 5ml花药浸提液 取 50个花药在 10ml花药培养基中研磨,然后用 80目筛过滤或在 1 000 r/m离心,取滤液加入到培养基中)。固体培养基灭菌后在凝固前加入到灭菌过的 6 cm培养皿中,每皿铺约 2mm厚,等完全凝固后,在其上层接种密度为 1×10^{4} 的花粉悬浮液,接种量以 1mm厚的液层为宜。一般 30~40 d即可长出肉眼能见的胚状体或愈伤组织,立即转移到新鲜的与上述相同的固体培养基上,培养 2~4周后再转入分化培养基。

四、花药和花粉培养中雄核发育的途径及雄核发育诱导

1. 花药和花粉培养中雄核发育的途径

在花粉的正常发育过程中,先是花粉母细胞经过减数分裂形成四分体,其周围由一层厚的胼胝质所包围。通常四分体时期比较短暂,最后由于胼胝质壁的溶解,四个小孢子彼此分开,释放到充满绒毡层分泌物的药室中。新形成的小孢子有浓厚的细胞质和一个位于中央的细胞核。当小孢子从四分体释放后,进一步形成明显的壁,同时体积迅速增大,细胞质发生液泡化,逐渐形成一个中央大液泡,细胞质成一薄层贴着细胞壁,细胞核从中央移到细胞的一侧,这就是通常所指的单核靠边期。小孢子经过一次不对称的有丝分裂形成一个小的生殖核和一个大的营养核,生殖核进行第二次有丝分裂,形成两个精子。由于物种的不同,生殖核的分裂可以在花粉中进行,也可以在花粉释放后在萌发的花粉管中进行。因此,当花药达到成熟时,花粉粒可能是 3—细胞的,即由一个营养细胞和两个精子组成,如白菜、向日葵和小麦等的花粉;也可能是 2—细胞的,即由一个营养细胞和一个生殖细胞组成,如烟草、棉花和百合等的花粉。

在花药和花粉培养的离体条件下,花粉的发育常常偏离体内时的正常发育而转向孢子体发育,从而形成胚状体或愈伤组织。根据小孢子最初几次分裂方式的不同,可将花药培养中雄核发育的途径归纳为以下 4种。

⑴ 营养细胞发育途径 (A途径)

单核小孢子先进行一次正常的非均等分裂,形成一个大的营养细胞和一个小的生殖细胞。生殖细胞或者完全不再分裂,或者分裂 1~2次后即行退化。营养细胞则继续分裂,形成胚状体或愈伤组织。这种发育途径在烟草、水稻、大麦、光叶曼陀罗、小麦、小黑麦和辣椒等植物中普遍存在。

⑵ 生殖细胞发育途径 (B途径)

在天仙子中,生殖细胞持续分裂,形成胚状体。而营养细胞可能不分裂,或只分裂数次形成一个胚柄状的结构,附着在由生殖细胞起源的胚的胚根一端。

⑶ 小孢子发育途径

单核小孢子进行有丝分裂形成两个等同的子细胞,而不是形成相互有别的营养细胞和生殖细胞。这两个等同的子细胞在染色体上是和典型的营养细胞相似,它们继续分裂,形成愈伤组织或胚状体。在烟草、水稻和小麦等植物中都存在这种发育方式。

⑷ 生殖细胞和营养细胞共同发育途径

单核小孢子进行非均等分裂形成营养细胞和生殖细胞,两个细胞都进一步分裂并参与孢子体的形成。毛叶曼陀罗在花药培养中获得的多倍性胚状体 (2n、3n和 4n),可能是由于营养核和生殖核融合而形成的。在天仙子中,有少量的花粉可由营养细胞和生殖细胞二者的分裂形成嵌合的单倍性胚状体。

2. 影响雄核发育的因素

⑴ 供体植物的基因型

植物基因型是影响花药和花粉培养形成单倍体最重要的因素之一。从花药培养诱导胚状体或愈伤组织的能力来看,在植物属间、种间或品种间均存在很大的差异。例如,水稻中粳稻比籼稻容易培养,粳稻花药愈伤组织的诱导频率平均可达 10%左右,而籼稻的平均诱导频率只有 1% ～2%。小麦不同品种间的差异也很大,欧柔 4号、西阿诺和小偃 759等品种花药愈伤组织的诱导频率可达 40%以上,而农大 139和农大 311等品种的花药培养则很难成功。叶兴国等 (1997)选用 31个栽培大豆基因型进行花药培养,几乎所有基因型都产生了愈伤组织,但愈伤组织诱导率的变异范围为 2.2% ～36.6%。其中有 8个基因型的愈伤组织诱导率大于 25%,6个基因型产生了芽或胚状体,只有丰收黄和鲁豆 10号两个基因型既产生了芽,又产生了胚状体,具有相对较高的培养能力。在油菜小孢子培养中,不同的供体材料,胚状体的产量不同。目前国内外两个最易形成胚状体的材料为 Topas和 G231,特别是 Topas,许多研究者均采用这一材料来进行研究 (官春云等,1999)。

另外,花药培养能力在有些植物中是可以遗传的,当某一杂种的亲本具有较高的诱导频率时,其产生花粉植株的频率也相应地较高。如在春大麦品种 Dissa与 Aramir和 Mutina的杂交组合中,亲本 Dissa的花药对培养具有较高的敏感性,Mutina次之,Aramir最小。在杂种 F_1 的花药培养中,两个组合的诱导频率分别位于两亲本之间,并且 Mutina×Dissa比 Aramir×Dissa的杂种 F_1 的诱导频率要高 (Wenzel等,1984)。

⑵ 供体植株的生理状态

花药供体植株的生理状态对花药培养效率有直接的影响。供体植株的年龄和所处的生长环境条件能够影响花药对离体培养的反应,起决定作用的环境因子有光照强度、光周期、温度、营养条件和 CO_2 的浓度等。供体植株要在比较适宜的条件下生长,定期施肥灌水,取样前的 3～4周内应避免使用任何杀虫剂。一般认为,大田植株比温室生长的植株更适宜于花药培养,相对幼年植株上开花始期的花对培养的反应较好。对水稻、小麦和大麦等禾本科植物而言,生长在大田的植株比温室植株、主茎穗比分蘖穗的花药愈伤组织的诱导频率明显要高。在甘蓝型油菜小孢子培养中,供体植株种植在控温控光的生长室中,有利于小孢子的脱分化和提高胚产量和成胚率。一般每天光照 16 h,在现蕾开花期昼夜温度分别为 10 ℃和 5 ℃为宜。

⑶ 花粉发育的时期

在花药培养早期的研究中发现,并不是任何发育时期的花粉都可以培养形成愈伤组织或胚状体,只有发育到一定时期的花粉对离体刺激才最敏感。选择合适的花粉发育时期的花药,是培养成功的关键因素之一。

被子植物的花粉发育经历四分体、单核期、双核期和三核期几个阶段,单核期又可分为单核早、中、晚(靠边)3个时期。不同的物种,适合培养的最适发育时期不同。对大多数植物而言,单核期的花粉培养比较容易获得成功。毛叶曼陀罗、烟草和块根芍药(*Paeonia hybrida*)的最适时期为正处于有丝分裂之前或分裂过程之中的花粉发育时期。颠茄和林生烟草(*Nicotiana sylvestris*)以双细胞早期最好。对于大多数禾本科植物的花药最适时期为单核中到晚期。水稻是单核中期至晚期,小麦和玉米是单核中期,大麦是单核晚期。天竺葵是四分体时期。拟南芥和番茄是减数分裂中期Ⅰ的花药培养效果最好。在芸苔属植物中,花粉在整个成熟过程中对于培养都能发生反应,其中成熟花药(二核花粉)对培养的反应最好。Sunderland(1971)对烟草不同花粉发育时期的培养反应进行了观察,试验结果如表 4.3所示。

表 4.3 烟草花粉发育时期与胚状体诱导频率

花粉发育时期	胚状体诱导频率/%
减数分裂期	0
单核早期	14
单核晚期	40
双核早期	55

(引自 Sunderland, 1971)

为了了解花药在离体条件下的培养反应敏感期的原因,有人进行了烟草的花粉发育研究。结果发现,烟草花粉在正常的活体内发育期间,单核小孢子在第一次有丝分裂之后能活跃地合成RNA、蛋白质和核组蛋白。但是,与 rRNA 合成有关的基因在第一次有丝分裂以后会关闭约 24 h。据研究,这一时期是花粉发育分化终端的临界期,凡是已经通过这一时期的花粉粒,都会不可逆地依一定程序进行配子体分化。因此,花药培养的取材时间必须掌握在这一时期之前,才有可能诱导花粉配子体改变发育方向按孢子体方式发育。在其它茄科植物中也观察到这一现象。

⑷ 预处理

为了提高培养效率,在花药或花粉接种之前,可对整个穗子、花蕾或花药进行一定的预处理,常用的有以下几种方法。

① 冷处理 一般是将欲接种的材料置于 3~6 ℃的条件下低温处理 3~15 d。不同的物种对冷处理的温度和处理时间有不同的要求。一般耐寒植物比喜温植物可耐受较低的温度。低温处理的时间根据所使用的温度而定,较低的温度处理的时间要短,较高的温度处理的时间宜长。表 4.4是几种植物常用的冷处理的条件。

冷处理能提高花药培养花粉胚胎发生的能力,主要归结于低温能使花粉保持较长的生活力,延缓花药壁组织的衰老和降低花粉的死亡率,从而增加有效存活的花粉数量,使较多的小孢子完成从配子体到孢子体发育类型的转变。许智宏等(1986)用显微分光光度计法测定花粉 DNA 含量时发现,大麦幼穗在低温处理期间,DNA 的合成并不停止,但速度大为降低。对单核晚期(G_2

期)的幼穗,花粉在低温处理过程中进行第一次分裂,形成营养细胞和生殖细胞,其中约有60%～70%花粉的营养细胞(核)DNA合成很快启动,从而使在处理结束时有相当一部分花粉的营养细胞和生殖细胞的DNA均已达到2C水平。这表明部分花粉已偏离正常的发育方式,在低温处理期间已完成诱导花粉转向孢子体发育的过程。在低温下完成DNA的合成及相对同步的发育进程,可能是花药在随后的培养中迅速开始分裂的重要原因。

表4.4　几种植物花药培养常用的冷处理条件

植物	处理温度/℃	处理时间/d
水稻	7～10	10～15
小麦	1～3	2～20
玉米	7	7～14
大麦	3～7	7～14
烟草	7～9	7～14
番茄	6～8	8～12
黑麦	1～3	7～14
油菜	6～9	5～6
柑橘	3	5～10
马铃薯	4	2

② 热处理　在一些物种中(如芸苔属),将花芽或完整植株在30℃下处理24 h或40℃下处理1 h,能够刺激花粉的胚胎发生。高温冲击似乎可引起微管的溶解和纺锤体的解体,从而导致小孢子核的不正常分裂。冉毅东等(1996)将马铃薯花药接种后置于35℃的温度下处理24 h,然后转入正常温度下培养,发现这一措施能显著地提高花药产生胚状体的数量。

③ 化学处理　现已发现有些化学药品能够诱导单性生殖(parthenogenesis)。乙烯利(ethrel)能促进许多物种单倍体的产生,用4 g/L乙烯利喷施花粉母细胞正在减数分裂时的小麦,因发生额外的有丝分裂,使含有较少淀粉粒的4～6个核的花粉增多,这种多核花粉在培养中有可能被诱导而形成胚。Picard等(1987)还报道用一种化学杂交剂(fenridazon－potassium)喷洒处于减数分裂前后的小麦植株,然后接种单核期花粉,能使花粉胚状体的数量提高3～20倍。

④ 其它方法　除了上述处理方法之外,用其它一些方法也可提高花药和花粉培养的效率。如将花药直接离心或在取出花药前将花蕾及幼穗进行短时间的离心,将花药置于高浓度蔗糖溶液中处理6～8 min等,都对提高花药的愈伤组织诱导率有一定的效果。

(5) 培养基成分

在花药和花粉培养中,培养基的成分是最重要的因素,它不仅决定着花药和花粉培养的成功,而且还影响发育的方式。目前还没有一种普遍适用于所有物种的通用的培养基。花药和花粉培养对营养条件的要求不但因基因型有所不同,而且还可能因花药年龄及供体植株的生长条件而异。与前面章节所介绍的培养基组成原理相同,花药和花粉培养基也由大量元素、微量元素、生长调节物质和有机物质等部分组成,这些都对培养效果产生直接影响。

① 无机盐　培养基中无机盐的成分,特别是硝态氮和氨态氮的浓度和比值,是影响花药培养形成愈伤组织的重要因素。如N6培养基通过大幅度降低培养基中铵离子的浓度和调整培养

基中氨态氮与硝态氮的比值使培养效率大大提高。

② 碳源 培养基中的蔗糖是较好的碳源,并且还起着调节渗透压的重要作用。不同植物的花粉细胞渗透压差异很大,因此花药培养时适宜的蔗糖浓度也不同。蔗糖浓度一般以 2% ~4%为宜,但高浓度 (6% ~12%)的蔗糖对禾谷类作物比较有利。烟草 3%、水稻 5%、小麦 8% ~10%、玉米 12% ~15%、马铃薯 6%和甘蔗 20%的蔗糖浓度下花药培养的效果较好。Sharp等 (1971)对番茄花药培养进行的不同蔗糖浓度的诱导反应试验证明,当蔗糖浓度达到 13%时才有较高的愈伤组织诱导频率 (表 4.5)。水稻、小麦和大麦等以 6%的麦芽糖代替蔗糖,也能使花药培养的效率大大提高。另外,用过滤灭菌的葡萄糖代替蔗糖,可明显地促进小麦花粉胚的形成和植株再生。

表 4.5 番茄花药培养愈伤组织诱导频率对蔗糖浓度的反应

蔗糖浓度/%	2	3	4	6	10	13	17
诱导频率/%	5	10	12	18	25	45	8

(引自 Sharp等,1971)

③ 激素 在花药的诱导培养期间 (脱分化),需要有较适宜的细胞分裂素和生长素配比,从而有效地诱导花粉细胞启动分裂,同时又控制二倍体细胞的分裂。一般来讲,花药壁二倍体细胞是已经高度分化的终端细胞,其重新分裂发育需要较高浓度的激素才有可能启动。因此,花药培养基的激素水平要相对较低才能抑制二倍体细胞的分裂。而对于大多数植物来讲,其花粉细胞的分裂启动亦需要一定的激素诱导。因此,确定适宜的激素浓度,以促使花粉细胞分裂的同时又抑制花粉壁二倍体细胞分裂是成功获得单倍体的关键。

由于植物的种类不同,诱导培养中使用何种激素及如何进行搭配并没有一个统一的规则,必须通过试验确定。对于诱导培养来讲,一般 2,4-D与 KT配合使用对于大多数植物都是实用的,均有成功的报道,但使用浓度各有不同。有些植物则使用 BA和 NAA效果较好。当使用 2,4-D与 KT时,其浓度对于诱导单倍体的频率有较大影响 (表 4.6)。高浓度的 2,4-D主要诱导花药形成愈伤组织,而不能形成胚状体,从而增加了二倍体细胞发育的机会。我们在马铃薯中观察到,当 2,4-D的浓度在 1mg/L以下时才可能有一定比例的胚状体形成,超过这一浓度则全部形成愈伤组织。

表 4.6 2,4-D和 KT浓度对茄子花药培养的影响

培养基	单倍体比例/%	二倍体比例/%
MS+2,4-D 0.5mg/L+KT 1mg/L	93.8	6.2
MS+2,4-D 2mg/L+KT 1mg/L	64.1	35.9

(引自王纪方等,1981)

花药和花粉培养常用的激素有:细胞分裂素类:BA、KT和玉米素。生长素类:NAA、IAA和 2,4-D。

④ 有机附加物 在培养基中添加某些有机物如水解酪蛋白、水解乳蛋白、酵母提取物、谷胱甘肽和一些氨基酸如谷氨酰胺、丝氨酸、脯氨酸、精氨酸、天冬氨酸和丙氨酸等,可以显著地提高

形成花粉胚及植株的频率。另外,在培养基中添加马铃薯块茎提取物特别有利于一些物种的花药培养。

⑹ 活性炭

在培养基中加入活性炭,有利于花粉胚状体或愈伤组织的发生,从而提高花粉植株的诱导率。在烟草、马铃薯、玉米、油菜、小麦和黑麦等植物的花药培养基中,加入 0.5% ～1.0%的活性炭可以有效地提高花粉植株的数量。活性炭的作用可能是吸附了琼脂中不利于花粉细胞生长的某些杂质,同时也可以吸附各种植物激素,从而调节内源和外源生长物质的水平。此外,活性炭还可以吸附在高压灭菌时由蔗糖还原而产生的一种有毒物质 5－羟甲基糠醛 (5－hydroxymethyl－furfural),它在花药培养中能抑制花粉胚的产生。

⑺ 花药壁因子

许多花药和花粉培养的实验表明,花药壁组织对诱导愈伤组织和胚状体的形成,甚至绿苗的分化起着重要的作用。Sharp等 (1971) 在培养的番茄花药上加一滤纸,然后把番茄的小孢子悬浮液滴于其中,使花药壁物质透过滤纸与小孢子接触,结果证明药壁对启动小孢子的分裂是有作用的。花药壁的作用在一些移植试验中也得到了证实,如把一个烟草品种开始有丝分裂时期的花药中的小孢子移植到另一品种的花药中,结果外来的花粉可形成小植株。Sunderland (1978) 曾提出花药壁因子作用的假设,认为花粉对花药壁因子的接受能力在不同发育时期也不一样,当花粉接受能力最大的时期与花药壁因子作用的最大时期一致时,这种植株的花药最容易被诱导。

组织学研究也证实了花药壁因子在诱导花粉胚中起着关键作用。在烟草中,只有原来贴靠着花药壁的花粉粒才能顺利发育成花粉胚。在天仙子中,也只有处在药室外围紧靠绒毡层的花粉能够发育成花粉胚。

⑻ 温度和光照

① 温度　离体培养的花药和花粉对温度比较敏感。对大多数植物而言,在 25～28 ℃的温度下进行花药和花粉培养是适宜的。但有不少植物的花药和花粉在较高的温度下培养效果更好,特别是在最初几天经历一段高温,会明显提高花粉胚和愈伤组织的诱导率。但在水稻花药培养中,随着培养温度的提高,花粉愈伤组织分化出白化苗的频率也会增加。

② 光照　禾谷类作物的花药和花粉培养,在愈伤组织诱导期间进行暗培养或在弱光或散射光下培养效果较好,当转移到分化培养基上之后,光照则有利于绿苗的分化,小植株的生长也比较健壮。当愈伤组织转移到分化培养基之后,一般先在暗中培养 3～5 d,再给以光强 1 000～2 000 lx 光周期 14 h的光照,则可以减少愈伤组织的老化坏死,提高绿苗分化率。在小麦愈伤组织分化期间以及以后的试管苗越夏期间,应给以短日照处理,否则试管苗移栽后会提前抽穗,甚至移栽前在试管中就会抽穗。在烟草中,连续光照可明显增加花粉胚的产量。在曼陀罗和马铃薯中,光照能增加反应花药的频率。

关于光质对花药和花粉培养影响的研究很少。在烟草花药培养中,与高强度的白光相比,在低强度白光或红色荧光下花粉胚的发育较快。在曼陀罗中,红光抑制花粉胚的产生,而蓝光和紫光对芽的形成有促进作用。

3. 雄核发育的诱导

对于大多数物种来说,适于诱导雄核发育的花粉发育时期是在花粉单核时,即在第一次有丝分裂即将开始、正在进行或刚刚结束的时候,此时对于诱导雄核发育的外界刺激最为敏感。

在烟草花药中进行超微结构的研究表明,在由开始花药培养到第一次异常分裂的诱导期中(一般需 6～12 d),配子体细胞质发生退化现象,胚性花粉营养细胞出现类似溶酶体的多囊泡体,这些囊泡区随培养时间的延长而增大。到了诱导结束时,在营养细胞中只剩下少数线粒体和结构上已变得比较简单的质体,聚集在营养细胞周围,核糖体和其它的细胞器已从细胞中消失了。在营养细胞完成了第一次孢子体分裂之后,细胞质内重新出现了核糖体和其它的各种细胞器。此时,营养细胞改变了发育方向转变为沿孢子体途径发育。用 RNA和蛋白质的特殊染色法处理胚性花粉,观察到在第一次孢子体的有丝分裂时期,染色多局限在两个核和核周围的一些细胞质上,而静止花粉缺乏可染色的成分。

Sunderland (1978) 认为在花粉群体中具有胚胎发生潜力的花粉,是在培养前被作用于活体的因素所预先决定的,离体花粉只是起孢子体发育的触发作用和维持相继的生长作用。这些具有胚胎发生潜力的花粉粒比正常花粉粒小,细胞质染色浅和发育延迟,把这种花粉称为 S—花粉 (special pollen) 或 E—花粉 (embryogenesis pollen)。在一个植物种或品种的花粉群体中,出现正常和非正常的两种类型花粉粒的现象,称为花粉的二型性 (dimorphism)。在天然情况下,这种非正常花粉粒将是无功能的雄配子体,但若遇到合适的培养条件,则会发育成胚。通过某种预处理如冷处理等,可以增加这种胚性花粉粒的数目。花粉二型性的理论在实践上具有重要意义。如果花粉转向孢子体发育途径是预先决定的,那么,在花药培养中要提高产生花粉胚状体或成苗的频率,以及解决尚未诱导成功的植物来说,研究重点应放在如何在活体上控制 S—花粉或 E—花粉的形成。但对于这一理论的真实性和普遍性,还需进行更多的实验和观察才能作出最后的结论。

五、花药和花粉培养中单倍体植株形成的途径

花药的结构包括花药壁、药隔和花粉粒。在一个花药中,既有单倍体的花粉细胞,也有二倍体的花药壁和药隔细胞。在培养中,单倍体细胞和二倍体细胞均有分裂的机会。在培养过程中,如何使花粉细胞发育而抑制 2n细胞分裂,对于这种调控机制的研究还不多。但在培养过程中的细胞学观察,为进一步研究使小孢子向我们所希望的方向发育提供了一定的基础。

Nitsch (1970) 在毛曼陀罗中观察到 4核花粉发育而成的胚状体 (embryoid)。在风信子的花药培养中发现,有些小孢子核连续分裂 3次,形成类似 8核胚囊的现象,称为花粉胚囊。这些反常的花粉没有授粉能力,但在诱导条件下可以形成胚状体,从而产生单倍体植株。有研究认为,冷处理、辐射等均可增加这种异常花粉的频率。不管发育初期花粉细胞通过何种途径发育,其结果均是形成一个细胞团,随后细胞团撑破花药壁再继续发育。细胞团的继续发育又有以下两种方式,决定了单倍体植株的形成途径。

1. 通过胚状体形成单倍体植株

通过早期的分裂,单个花粉粒细胞形成了一个多细胞团,这种多细胞团从花药壁中释放出来后按照合子胚的途径发育,即经过球形胚 (globular stage embryo)、心形胚 (cordate stage embryo)、鱼雷形胚 (torpedo stage embryo) 和子叶形胚 (cotyledinous stage embryo) 的发育过程。

一般我们把没经过受精过程而发育形成的胚形结构称之为胚状体。由胚状体的发育过程我们可以看出,一个花粉粒只形成一个胚状体,一个胚状体萌发出一个植株。也就是说,通过胚状

体形成的植株均来自于单个花粉粒。这在实际应用中有着非常重要的意义。

Sunderland等（1978）认为，胚状体和愈伤组织的产生在发育早期即已基本确定。烟草离体培养的花粉，单核花粉一般在 24～48 h内即进行第一次有丝分裂，然后形成 20个细胞左右的小胚状体，此时全部停留在小孢子的外壁内。培养 14～21 d后，小孢子外壁破裂，大约 30 d时，球形胚状体冲破花药壁释放出来。Nitsch（1974）观察到，在早期阶段，胚状体像吊带一样固定在花药壁内。进一步研究还发现，花药中的胚胎发生是不同步的，可以同时观察到几个发育阶段。

从理论上讲，培养条件下每一个花粉粒均是一个单倍体植株，那么一个花药的花粉就可以产生成千上万的单倍体植株，但事实上这是不太可能的。在一个花药中可以形成几个、十几个甚至上百个胚状体，但在以后的发育中大部分遭到破坏，或是退化、或是成为无限生长的愈伤组织。因此，到最后一个花药只能形成几个胚状体。

为了提高胚状体的诱导频率，许多学者进行了不同因素的观察和研究。与胚状体形成关系最为密切的因素至少有遗传背景、花粉发育时期、生长激素等。茄科植物在培养中或易或难均有可能产生胚状体，但有些植物如水稻、小麦等则很难形成胚状体。即使是同一种植物的不同品种或类型，其胚状体形成能力的差异也十分明显。王玉英等 1981用 19个甜椒品种试验，在低浓度的生长素条件下，有 3个品种较易诱导胚状体，11个品种有个别胚状体产生，另外 5个品种则完全不能形成胚状体。

花粉的发育时期不仅影响花药培养的成功与否，同时也影响花药植株的发生途径。如番茄，刚完成由四分体解体时的花粉能形成胚状体，双核期以后则完全不能形成胚状体。马铃薯亦有类似的情况。

此外，大量试验结果表明，培养基的基本成分对胚状体的产生并没有明显影响，但生长素水平则影响显著。低浓度生长素有利于胚状体的诱导，高浓度则产生愈伤组织。甜椒花药培养中NAA浓度对胚状体诱导的影响试验表明，随着 NAA使用浓度的升高，胚状体诱导频率下降（表 4.7）。在茄子的花药培养中，若将刚刚能见的胚状体提前转入到 MS＋NAA 0.005 mg/L＋KT 1mg/L＋蔗糖 2%的培养基上培养，可以在一个花药中获得了 10个胚状体，有的获得几十个胚状体，能有效改善胚状体的诱导率。

表 4.7　NAA浓度对甜椒品种“二猪咀”花药诱导胚状体的影响

NAA／(mg/L)	0.25	1.0	2.0
胚状体／%	6.45	1.9	1.11

（引自王纪方等，1981）

2. 通过愈伤组织形成单倍体植株

花粉粒早期分裂的细胞团如果一直保持无序分裂状态，就会形成多细胞团的愈伤组织，这种愈伤组织可以进一步分化成植株，这是一个常见的获得单倍体植株的途径。可以说，到目前为止，大多数花药培养成功的植物都有由这一途径产生单倍体植株。

但是，通过愈伤组织形成的植株其倍性常不只是单倍体，也有二倍体，有时还有多倍体、混倍体等（表 4.8）。这是因为愈伤组织既可来源于花粉细胞，有时也可能是由二倍体组织的细胞发育而成。并且在发育过程中，最初来源于单个花粉粒的细胞团，常会出现几个融合在一起进而形成一个愈伤组织的现象。有时也可能出现一个多倍体细胞团和一个二倍体细胞连在一起的情

况,这样在植株分化时就会出现混倍体现象。

表 4.8 马铃薯花药培养中胚状体和愈伤组织的倍性

植株来源	倍性	细胞类型
胚状体	n	单个花粉粒
愈伤组织	n,2n,2n+	单个或多个花粉粒、花粉细胞与花药壁细胞等

(引自王纪方等,1981)

花药和花粉培养雄核发育和形成单倍体植株的全过程如图 4.5所示。

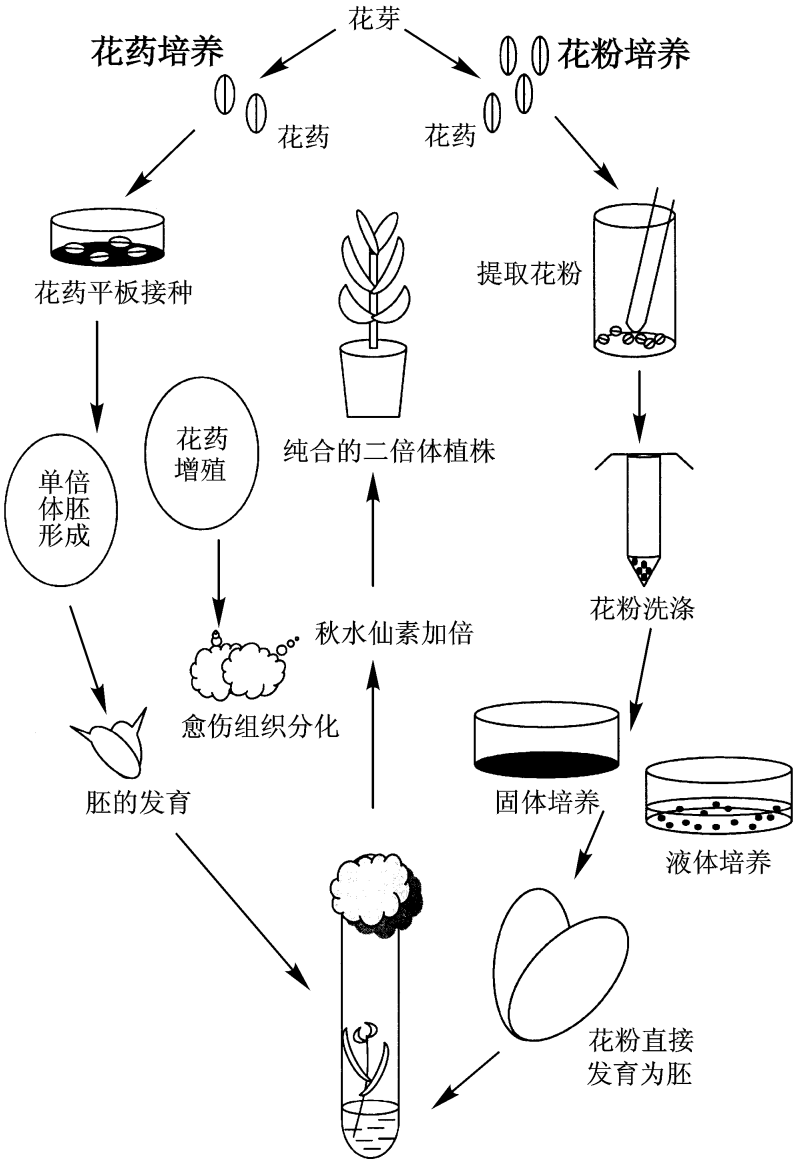


图 4.5 花药和花粉培养雄核发育和单倍体植株形成图解

六、花粉植株的倍性及染色体加倍

1. 花粉植株的倍性

由花粉发育成的花粉植株,并不像所期望的那样都是单倍体,其中不但有二倍体,还有多倍体和非整倍体。非整倍体植株出现的频率与植物的种类、接种花粉的发育时期、培养基中激素的

种类和浓度、花粉植株发生的方式及愈伤组织继代培养时间的长短密切相关。一般认为，由花粉愈伤组织再生的二倍体及多倍体来源于核内有丝分裂或营养核与生殖核的融合细胞。以烟草为例，花粉植株绝大多数是单倍体，但接种双核期花粉比单核期花粉能获得更多的二倍体；在含有细胞分裂素的培养基上产生的愈伤组织比不加激素的培养基上产生的愈伤组织的二倍体比例显著增高；通过胚状体途径产生的花粉植株几乎全是单倍体，而经愈伤组织产生的花粉植株中有不少是二倍体，并且愈伤组织继代培养时间愈长，二倍体的比例就越高。在小麦花粉植株中染色体数目变化更大，从 11～77条染色体的各种植株都有，但单倍体和二倍体占大多数，其中单倍体约占 70%。

2. 染色体加倍

单倍体植株由于缺少同源染色体，减数分裂不能正常进行，因而不能形成有活力的配子。虽然在花粉植株中可自然加倍形成纯合二倍体，但其频率太低。为了得到可育的纯合二倍体，必须通过人工方法，把单倍体植株的染色体加倍成为纯合二倍体。

染色体人工加倍最常用的方法是用一定浓度（0.02%～0.4%）的秋水仙素处理单倍体植株，处理方式和部位随植物种类而异。对于双子叶植物，可将单倍体花粉植株的试管小苗在过滤灭菌的秋水仙素溶液中浸泡 24～48 h，用无菌水冲洗后再接种于新鲜培养基上使其进一步生长。对于生长在田间的单倍体植株，可用含有秋水仙素的羊毛脂处理其生长点、顶芽、腋芽和花芽，处理营养芽后有 25%左右的幼苗可成为二倍体，处理花芽的有 50%以上的植株可加倍结实。禾本科植物单倍体植株的加倍通常所用的方法是，用含有 1%～2%二甲基亚砜（DMSO）的秋水仙素浸泡分蘖节。在分蘖盛期，将花粉植株从土壤中挖出，洗净根部的泥土，将分蘖节以下部分浸泡在 0.05%～0.1%秋水仙素溶液中 48～72 h，处理结束后，流水冲洗 0.5 h，然后移入土壤中。经加倍处理有 50%～70%的植株可部分结实。

染色体加倍的另一方法是愈伤组织加倍法。将单倍体植株的叶、茎、叶柄和根等器官切成小块后置于一种适当的培养基上，诱导形成愈伤组织，经过继代培养之后，转移到分化培养基上，由此所获得的再生植株中，将会有染色体加倍的植株。另外，在花药（粉）愈伤组织增殖过程中，往往可通过核内有丝分裂使染色体加倍。延长愈伤组织培养的时期，可提高染色体加倍的频率，但过分延长愈伤组织培养的时间，将会降低或丧失其再生植株的能力。

七、花药和花粉培养中的白化苗

在禾谷类植物的花药培养中经常会出现白化苗。禾谷类植物的花粉愈伤组织在器官分化时，叶绿体的发育一般是和芽组织的分化同时进行的，由愈伤组织上芽点的颜色可以判断分化出来的将是绿苗或是白苗。花粉白苗除外观上缺乏绿色外，并无其它形态上的变异。缺绿的程度由完全白色到浅黄色不等，此外，有时还存在一种叶面呈绿白镶嵌的条纹状植株，但此种植株数量甚少。愈伤组织分化绿苗或白苗的特性是相对稳定的，绿苗和白苗混生的现象只占极少数。一块愈伤组织上可以分化出不止一株白苗，但很少有绿苗混生，分化绿苗的愈伤组织也很少混生白苗。影响花粉白苗形成的因素可能有供体植物的基因型、花粉发育的时期、培养基的成分和培养条件等。

1. 影响白化苗形成的因素

(1) 供体植物基因型

花药培养中花粉白苗率与接种材料的基因型有关。不同的植物种类及同种植物的不同品种之间分化白化苗的频率差异较大。小麦、水稻和大麦花药培养中出现白化苗的频率较高，一般要占 1/3以上，有时甚至高达 80% ～90%，而玉米花粉植株中的白化苗却较少。除葡萄外，在禾本科以外的植物花药培养中尚未发现白化苗。

⑵ 花粉发育时期

花药培养中，白化苗的比例随接种时花粉发育时期的延迟而提高，小孢子已完成有丝分裂的花药往往只能得到白化苗。

⑶ 培养基成分

培养基对花粉白化苗形成的影响主要在愈伤组织发生阶段，受分化培养基的影响较小。在小麦花药培养中，12%的蔗糖比 6% ～10%的蔗糖浓度有更高的绿苗率。高浓度的 2,4－D也可使所产生的愈伤组织分化更多的白化苗。但调整培养基的成分也不能从根本上控制白化苗的形成。

⑷ 培养温度

培养时的温度也影响白化苗的形成。当培养温度提高时，白化苗的数目也随之增加。据研究，在大麦中温度为 25℃时愈伤组织的总分化率为 30.4%，其中绿苗占 36%，白苗占 64%；当温度提高到 28℃时，总分化率降为 16.4%，其中白苗高达 92%。在水稻中，若将温度提高到 35℃，白苗的频率在有的研究中高达 97.1%。

2. 白化苗的细胞学和生理生化特性

白化现象是不可逆的。如果培养小麦花粉白化苗的叶片，所得到的再生植株全部为白苗，说明白化现象很可能是一种特殊的变异或突变。在白苗及分化白苗的愈伤组织细胞中常见到微核，其往往起源于断裂染色体，因此染色体结构的变异可能是白化苗的成因。

梁志成等（1978）采用扫描电子显微镜观察，分化绿苗的愈伤组织结构致密，细胞呈圆形或椭圆形，内含物丰富。而分化白苗的愈伤组织结构较前者疏松，细胞由于内含物较少，呈不同程度的内陷，细胞壁弯曲度较大，其上有粗细分支明显的皱纹。从花粉白苗亚显微结构中看不到有正常发育的叶绿体。在白化苗叶片细胞中，除质体发育受到阻碍外，还没有观察到细胞器结构上的异常变化。白化苗的质体可以长大，但通常只含有一些不规则的初始片层和嗜锇球体，没有基粒结构，估计是由 DNA到 RNA的转录过程发生了障碍。孙敬三等（1978）用聚丙烯酰胺凝胶电泳法研究了绿色和白化花粉植株中核糖体 RNA（rRNA）的组成，结果可将绿色植株的 rRNA分成 4条相对分子质量带，即细胞质核糖体的 25S RNA和 18S RNA以及质体核糖体的 23S RNA和 16S RNA。而在白化植株中，质体核糖体的 23S RNA和 16S RNA不存在或含量很少。到目前为止，白化苗形成的机理仍不十分清楚。从根本上解决白化苗的问题，还有待进一步的研究。

八、单倍体的应用

1. 迅速获得纯合型材料

在育种实践中，单倍体可通过染色体加倍，产生遗传上纯合的和性状上稳定的二倍体纯系。在具有高度杂合性的异化授粉作物中，采用常规的育种程序，至少需要 6～8代的自交，才能获得纯合的基因型。而采用花药（粉）培养的方法，只需一个世代便可获得纯合的二倍体，因此可以大大缩短育种周期。

在常规的杂交后代中，由于存在显、隐性的干扰，从而影响选择的准确性和效果。而在加倍单倍体的后代中，只有一种基因型和表现型，不存在显性性状掩盖隐性性状的问题，不良性状在当代即可表现出来，便于淘汰。因此，利用花药（粉）培养的单倍体育种技术，可以提高选择效率，缩短育种年限，节省人力和物力。

利用单倍体产生的纯合二倍体代替自交系，可用于杂种优势的利用。单倍体加倍品系的纯合度比常规自交选育的自交系要高，利用这种高度纯合品系组配的 F_1 杂种，可获得最大的杂种优势。单倍体加倍品系之间组配的 F_1 杂种，在产量、生长势和整齐度等方面都优于常规自交系之间组配的 F_1 杂种。

利用花药（粉）培养的单倍体育种技术与传统育种方法相结合，我国研究者先后培育出了京花 1号、花培 1号、京花 3号、京花 5号、花培 764、张春 11号、甘春 16号、奎花 1号、峡麦 1号、花 28和花 555等 20多个小麦新品种（系），已累计推广超过 89万 hm^2。采用这一技术途径，我国还培育出了中花 8号、中花 9号、中花 10号、中花 11号、朝花矮、宁糯 1号、宁糯 6号、浙农大 40、浙农 45、单 209、浙粳 66、赣早籼 11号、京花 101、京花 103、中花 12号、2205和花 8504等 100多个水稻新品种（系），已累计推广面积近 91万 hm^2。另外，我国还选育出了一些具有应用和研究价值的烟草、玉米、大麦和甜椒等的新品种（系），取得了明显的经济效益。我国在花粉单倍体育种上取得的突出成就，赢得了国际同行的普遍赞誉。

但是，利用花药培养进行单倍体育种时，尚存在诱导频率低、混倍现象严重和体细胞干扰等问题，需进一步研究加以解决。

2. 获得育种中间材料

通过花药和花粉培养获得的单倍体，一个个体就是一个基因型，加倍后就可以获得各种显、隐性纯合的材料。特别是多倍体植物的单倍体，有可能使得在原始多倍体中不可能表达的隐性性状得以表达，从而获得丰富的遗传种质。此外，倍性操作还可以使某些不同倍性的材料间进行有性杂交，从而获得更广阔的遗传背景。如 2x×4x往往不易成功，但如果将 4x转换为 2x后再与原有的 2x杂交（2x×2x），则可能成功，从而有希望获得遗传远缘的杂交材料。

3. 突变体选育

单倍体植物只有一套染色体，不存在显、隐性的干扰，一旦基因发生突变，在当代花粉植株上即可表现出来。因此，突变体的形成可在营养体阶段直接发现和选择，甚至还能得到那些不能经过有性阶段的突变体。用化学药物或辐射等物理方法处理单倍体的小孢子，能提高诱变频率，从而获得变异广泛的突变体。通过花药（粉）培养技术，还有可能获得抗病、抗虫、抗盐碱等的突变体。Wenzel等（1981）用花药培养的方法，培育出了对马铃薯囊线虫具有抗性的突变体。

4. 体细胞融合

两个单倍体细胞融合后，倍性即可能恢复正常。因此，如果将单倍体倍性操作与细胞融合技术结合，将有可能形成新的植物育种途径和方法，从而有利于更广泛地利用遗传资源，提高育种效率。

5. 获得染色体异附加系和代换系

通过花药（粉）培养除可以得到大量的单倍体和纯合二倍体植株外，还可以得到多倍体、非整倍体、混倍体和染色体结构变异的植株。采用遗传背景丰富的材料如远缘杂种进行花药培养，可以预期选育出具有优良性状的新品种和具有独特遗传特性的新类型。与远缘杂交相结合，可

直接产生各种异源非整倍体,如异源代换系、附加系以及易位系等,从而实现物种之间基因的转移。例如,以黑麦与普通小麦的杂种 F_1 为材料进行花药培养,能使杂种 F_1 的花粉染色体多样性直接在植株上表现出来,经染色体加倍后,可以从中选出异附加系和代换系等 图 4.6)。

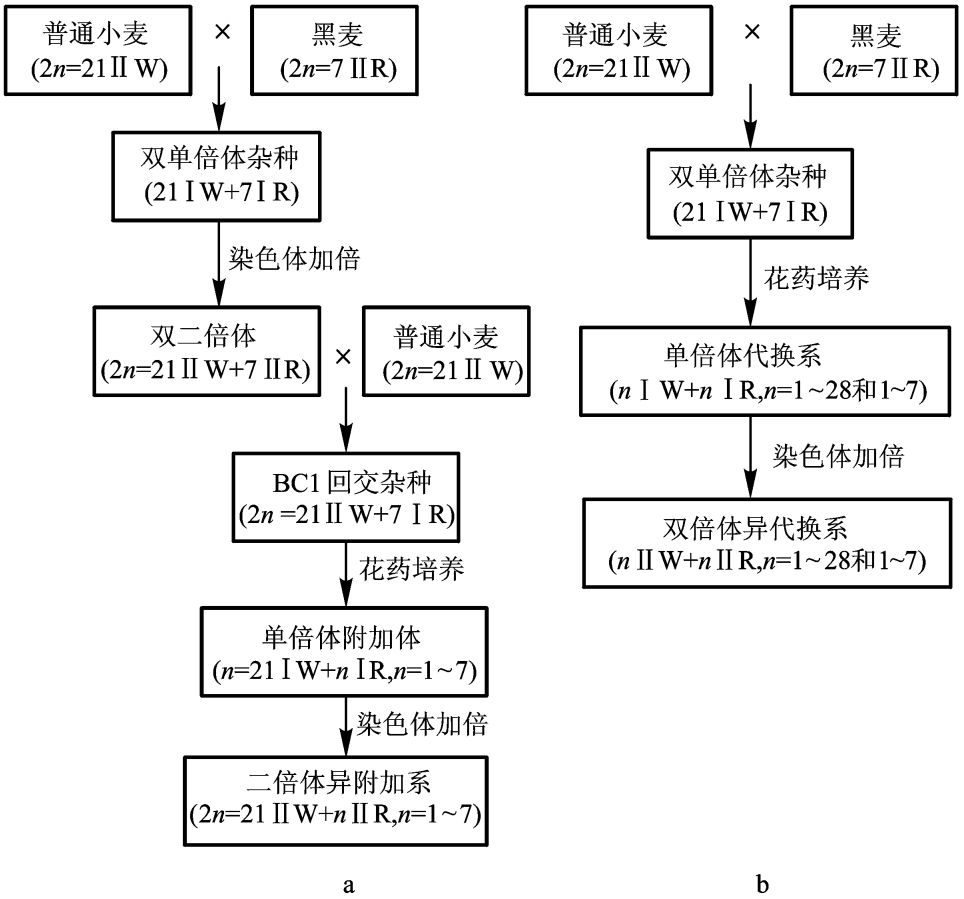


图 4.6 花药培养创造异附加系和代换系示意图
a 异附加系的选育过程;b 异代换系的选育过程

6. 遗传研究

由于单倍体只含有一个单一功能的基因模式,排除了杂合性等因素的干扰,因而在单倍体水平上对于基因剂量效应的研究也将更为方便。

从遗传的角度看,每一个花粉粒即是一个基因型。因此,直接由花粉粒形成的植株也就充分地展示了其基因型所反映的表现型。对于一个杂合性材料来讲,也就反映了其后代的分离状况。依据这一特点,可以很快建立稳定的分离群体,供遗传研究应用。

而且,利用单倍体还能产生非整倍体如单体、缺体和三体等,从而为研究细胞遗传学中突变的作用、染色体及染色体组的进化、染色体和基因的剂量效应、减数分裂配对的基础、数量性状遗传和连锁等许多基本问题提供了适宜的材料。单倍体还能为植物种属基本染色体数的起源提供证据,例如在美国狼尾草 (Pennisetum americanum) 中,有一些细胞出现了染色体的配对,形成了两个二价体,从而表示其基本染色体数有可能为 x=5。

利用花药(粉)培养诱导的单倍体,经染色体加倍后可得到高度纯合的二倍体材料,由这种纯合二倍体产生的双单倍体 (double haploid, DH) 株系,可以保持群体中每个植株的基因型,便于进行连续多年的研究,而且由同一群体获得的遗传学数据均可累加。在植株的表现型和分子标记上,基因均表现为 1:1分离。因此,DH群体是比较理想的作图群体之一,这种群体现已广泛

地应用于大麦、水稻和油菜等作物主要基因和数量性状遗传图谱的绘制。

7. 遗传工程受体

就目前所采用的遗传转化（genetic transformation）方法来讲，大多是通过一定的载体（vector）将目的基因（target gene）导入受体（receptor）之中。当目的基因进入受体以后则必须与受体细胞的染色体发生整合才能稳定地表达。而这种整合往往最先发生在一条染色体上，而后通过遗传修复，要么将其补齐，要么将其丢失，这也是遗传转化效率不高的原因之一。如果利用单倍体作为转化受体，经过转化的单倍体加倍后则可以保证二倍体的两条染色体上均具有目的基因，这样就可以大大提高转化效率。

第三节　植物胚培养

植物的胚发育一般是从受精以后的合子开始的。胚的组成除了由合子发育的胚以外，其整个子房都属于胚的范畴。根据在培养中所取的外植体的部位不同，植物胚培养包括胚培养（embryo culture）、胚珠培养（ovule culture）、子房培养（ovary culture）和胚乳培养（endosperm culture）。在这些培养类型中，胚和胚乳培养的取材事实上是植物种子的不同部位，胚珠和子房培养由于取材的时期不同，有时可能是受精以后的胚珠和子房，有时则可能是未受精的胚珠和子房。由于胚胎培养的外植体不同，培养的难易也各不相同，其应用目的亦不尽相同。因此，在实际工作中，我们可根据研究目的、试验条件来选择培养类型，以便达到经济、有效的培养效果。

一、植物胚培养

1. 胚培养的意义和类型

(1) 胚培养在实践中的应用意义

① 克服杂交育种中杂种胚的早期夭折　在远缘杂交育种中，经常发生杂种不育现象，其原因是比较复杂的，其中主要有胚的发育不良，提供营养来源的胚乳不能正常发育，以及有时胚与胚乳之间形成的障碍物质阻碍了营养物质的运输等，从而造成胚的早期败育。为了解决杂种胚不能正常发育的问题，利用幼胚离体培养是一个非常有效的途径。

在自然发育条件下，大白菜与甘蓝的远缘杂种往往在杂交 20～30 d左右杂种胚即退化夭折。在杂种幼胚退化前取出进行离体培养已获得成功，并得到了杂种植株。由于大白菜 $2n=20$，甘蓝 $2n=18$，其杂种 $2n=19$是不育的。用这种杂种加倍获得四倍体 $2n=38$的植株则可育，有人将用这种方式所育成的品种称为“白蓝”，许多这种类型的“白蓝”品种已在生产上推广应用。幼胚培养还用于某些胚后熟的植物育种，如早熟桃的育种等。

② 克服珠心胚干扰，提高育种效率　在自然界，有些植物的种子存在多胚现象，如柑橘、芒果等，其中只有一个胚是通过受精产生的有性胚，其余的胚多是由珠心细胞发育而成，因此称为珠心胚。在杂交育种中，由于珠心胚的干扰，常常很难确定真正的杂种，有时珠心胚甚至造成杂种胚夭折。通过幼胚培养即可以克服这一障碍。

③ 理论研究领域的应用　胚培养可用于探讨植物器官发生过程的许多理论问题，研究胚发育中胚乳的作用和进行胚胎切割实验等。

⑵ 胚培养的类型

植物胚培养通常是指从种子或果实中剥离取出胚进行离体培养的技术。根据胚培养的取材时期不同可以分为两类：成熟胚培养和幼胚培养。

① 成熟胚（mature embryo）培养 一般所要求的培养条件和操作技术均相对简单，实质上是胚的离体萌发生长，因此，它的发育过程与正常的种子萌发没有本质上的区别。成熟胚培养较适用于珍稀杂种的种子萌发及某些难繁殖植物的抢救等，可以克服由种皮或果皮等造成的发芽障碍，同时亦可避免自然环境对种子萌发的不利影响，特别是对某些结实困难或种子休眠期过长的植物更为有效。

② 幼胚（immature embryo or larva embryo）培养 幼胚培养是指未发育成熟的胚培养，它要求较好的培养条件和较复杂的操作技术（胚剥离）。所以，这一节中我们主要介绍幼胚培养的有关技术。

2. 幼胚培养

在谈到幼胚培养时，我们有必要提到以下 3位学者的工作，他们在幼胚培养技术的建立上作出了很大贡献。Hanning早在 1904年就培养了萝卜和辣根菜的胚，发现离体胚可以充分发育，并且提前萌发形成小苗，这是世界上胚培养最早获得成功的一例。Laibach在 1925—1929年间，通过培养亚麻种间杂种幼胚，成功地获得了种间杂种，首次证实了这种方法在实际应用中的价值。他指出，在所有不能形成有生活力种子的杂交中，均可以采用幼胚培养产生杂种。李继侗 1933年在银杏培养中发现胚乳提取物能够促进银杏离体胚的生长。这一发现为后人使用植物胚乳汁液、幼嫩种子及果实提取液等天然物质促进培养物生长提供了重要的启示和参考。

⑴ 幼胚培养的基本技术

① 取材 大多数幼胚培养成功的实例证明，适宜于幼胚培养的胚发育时期多为球形胚至鱼雷形胚。在形成球形胚之前的原胚阶段，剥离和培养均比较困难。以幼胚抢救为目的的胚培养取材，还应了解胚退化衰败的时期，以便在此之前取出幼胚进行培养。一般来讲，幼胚死亡时间越早（如球形期之前），抢救工作就越困难。

胚培养在取材时常常是连同果实一起取下来，然后对果实或种子进行消毒，由于胚包被在种皮内，因而一般是不带菌的。只要果实种子消毒彻底，在无菌条件下分离出的幼胚一般不会造成污染。

② 幼胚剥离 在进行幼胚培养时，比较重要的一点就是必须把胚从周围的组织中剥离出来。因为一个胚就是一个植株的另一种形态，因此胚剥离的成功与否是幼胚培养能否成功的关键。对于大多数植物的幼胚剥离来讲均要借助解剖镜，特别是那些种子较小的植物更是如此。另外，幼胚是一种半透明、高黏稠状组织，剥离过程中极易失水干缩，因此，在剥离时一定要注意保湿，且操作要迅速。有关胚发育的细胞学和生理生化研究表明，胚柄（suspensor）积极参与幼胚的发育，特别是球形期以前的幼胚。因此，许多学者认为，幼胚培养需要带胚柄结构，所以幼胚剥离时应带胚柄一同取出。

③ 接种培养 剥离出来的幼胚要立即接种到培养基上进行培养。胚培养相对于其它培养来讲要容易一些，但是，在培养之前必须对所培养的对象在自然发育条件下的特性充分了解。如胚的休眠问题，是否需要春化作用，胚萌发的温度等，这些对提高胚培养的成功率均有重要影响。

⑵ 幼胚离体培养的生长发育方式

幼胚培养中，常见的生长方式有 3种。

① 胚性发育（embryonal development）　幼胚接种到培养基上以后，仍然按照在活体内的发育方式发育，最后形成成熟胚（有时甚至可能类似种子），然后再按种子萌发途径出苗形成完整植株。这种途径发育的幼胚，一般一个幼胚将来就是一个植株。

② 早熟萌发（early mature sprouting）　幼胚接种后，离体胚不继续其胚性生长，而是在培养基上迅速萌发成幼苗，通常称之为早熟萌发。在大多数情况下，一个幼胚萌发成一个植株，但有时会由于细胞分裂产生大量的胚性细胞，以后形成许多胚状体，从而可以形成许多植株，这种现象就是所谓的丛生胚现象。

③ 愈伤组织（callus）　在许多情况下，幼胚在离体培养中首先发生细胞增殖，形成愈伤组织。一般来讲由胚形成的愈伤组织大多为胚性愈伤组织，这种胚性愈伤组织很容易分化形成植株。此外，通过胚培养获得的这种胚性愈伤组织亦是很好的遗传受体和分离原生质体的来源。

胚培养中胚的发育方式可以在一定程度上通过培养基和培养条件进行调节，使其发育按照我们的试验目的进行。如试验的目的是获得植株，就可以使其按胚性发育和早熟萌发途径发育。如果是为了获得大量的胚性细胞，则可以促使其增殖成为愈伤组织。这种调节常常是通过培养基来实现的。

3. 幼胚培养条件

(1) 培养基

成熟胚对培养条件的要求一般不是很高，甚至在含有基本培养基成分的培养基中即可生长。但未成熟幼胚对培养基的要求则较严格，不仅必须有完全的营养成分，而且对培养基的渗透压、激素水平及附加成分均有一定的要求，其中影响较大的有蔗糖浓度、激素种类、激素配比和附加成分等。

蔗糖在幼胚培养中起着两个重要的作用：一是提供碳源，二是调节渗透压。如果只是考虑碳源，并不需要很高的浓度。但是，幼胚本身生活在较高渗透压的液体中，当它离体培养时，就必须要求有与活体内一致的渗透压环境。一般来讲，蔗糖使用的浓度大多在 4% ～12%。幼胚所处的发育阶段越早，所要求的蔗糖浓度越高，如球形胚一般要求蔗糖浓度为 8% ～12%，而心形胚至鱼雷形胚则只要求蔗糖浓度为 4% ～6%。

幼胚培养中外源激素是必需的。低浓度的 GA_3 和 KT能促使幼胚早熟萌发，GA_3 有时甚至具有胚柄的作用。因此，在胚培养中 GA_3 是必不可少的生长调节物质，但使用浓度一般较低，不宜超过 0.5mg/L。IAA和 ABA具有抑制早熟萌发和促进胚正常发育的作用，但其使用浓度应严格控制，一般以低浓度为宜，且因不同的植物而有所变化。此外，生长素与其它激素的比例有时也会严重影响胚的发育方式，生长素比例高时一般容易形成愈伤组织。

就营养需求来讲，胚的发育可以分为两个不同时期：a. 异养期。在这一时期，胚的发育要依赖于胚乳和周围的母体组织提供营养。b. 自养期。在这一时期胚在代谢上已能通过吸收培养基中的基本无机盐和糖来合成自身生长所需的物质，在营养上已可以完全独立。胚由异养转为自养是一个关键时期，许多胚夭折多发生在这一转变时期。一般来讲，球形胚以前为异养阶段，心形胚以后即转为自养阶段，但因作物不同有时会有一定的差异。无论如何，离体培养的幼胚大多还处于异养阶段，除了基本的培养基营养外，胚乳提取物对幼胚的培养一般是必不可少的，我们可以选用椰乳、玉米胚乳提取物和麦芽提取物等。

常用的植物幼胚培养基见表 4.9。

表 4.9 植物幼胚培养常用培养基

成分	培养基／(mg/L)				
	Tukey (1934)	Randolph & Cox (1943)	Rijven (1956)	Rangaswamy (1961)	Norstog (1963)
KNO_3	136	85	—	80	160
$CaCl_2$	—	—	55	—	—
$Ca_3(PO_4)_2$	170	—	—	—	—
$Ca(NO_3)_2$	—	164	236.8	—	—
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	—	—	—	260	290
$CaSO_4$	170	—	—	—	—
Na_2SO_4	—	—	—	200	200
$Na(PO_3)_n$	—	10	10.0	—	—
NaH_2PO_4	—	—	—	165	—
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	—	—	—	—	800
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	—	—	—	0.025	—
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot H_2O$	—	—	0.12	—	—
KH_2PO_4	—	—	340	—	—
K_2HPO_4	—	—	87	—	—
KCl	680	65	65	65	—
$MgSO_4$	170	18	—	—	140
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	—	—	49	360	730
$FePO_4 \cdot H_2O$	170	—	—	—	—
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	—	1.2	—	—	—
$FeC_6H_5O_7$	—	—	—	—	10
$FeC_6H_5O_7$ (1%)	—	—	3	—	—
$FeC_6H_5O_7 \cdot 3H_2O$	—	—	—	10	—
$MnSO_4$	—	—	0.45	—	—
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	—	—	0.5	3	—
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	—	—	0.287	0.5	0.5
H_3BO_3	—	—	—	0.5	0.5
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	—	—	—	—	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	—	—	0.024	0.025	0.25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	—	—	—	—	0.25
柠檬酸铁 · $5H_2O$	—	—	15	—	—
甘氨酸	—	—	—	7.5	—
盐酸硫胺素	—	—	—	0.25	0.25
盐酸吡哆醇	—	—	—	0.25	0.25
烟酸	—	—	—	1.25	1.25
泛酸钙	—	—	—	0.25	0.25
蔗糖	20 000	20 000	—	20 000	90 000
葡萄糖	25 000	25 000	—	—	—

⑵ 光照

对于幼胚培养来讲,培养初期的黑暗条件是必要的。其黑暗培养的时间与胚的发育时期有关,越是处于发育早期的胚,需要黑暗培养的时间就越长。大多数处于球形期至心形期的幼胚,需要在黑暗条件下培养两周后再给予光照。芥菜试验证明,早期光照不利于胚根(radicle)的发育,但胚芽(plumule)的发育要求一定的光照条件。对于大多数植物来讲,离体幼胚培养已经启动发育以后,给予和其自然光周期一致的光照条件有利于幼胚发育。

⑶ 温度

幼胚培养的温度一般以该植物种子萌发的适宜温度为好。有些植物的幼胚培养在给予适宜温度之前要求一定的低温处理。如桃的幼胚培养需要在 2～4℃条件下处理 40～60 d,然后再转入 25℃条件下培养。

二、子房培养

子房培养包括授粉前和授粉后的子房培养。1942年,La Rue首先对番茄、伽蓝菜属(Kalanchoe)、连翘属(Forsythia)和驴蹄草属(Caltha)授粉的花并带一段花梗进行了培养,在无机盐培养基上得到了正常的果实。这一工作可以认为是子房培养的开始。1949年和 1951年 Nitsch建立了较完整的子房培养技术。他培养了小黄瓜、番茄、菜豆、草莓和烟草等植物授粉前和授粉后的子房,在含蔗糖的无机盐培养基上,授粉后的小黄瓜和番茄获得了成熟果实及具有生活力的种子。未授粉的子房在同样的培养基上没有显著变化,而在加有生长素的培养基上,未授粉的番茄子房发育成了小的无籽番茄果实。子房培养在研究果实发育,离体授粉受精等方面具有重要意义。

近年来,由于花药培养在许多植物上诱导花粉植株的频率较低,有的甚至不能诱导产生花粉植株,从而影响了花粉单倍体育种方法的应用。因此,国内外许多研究者对未授粉子房的培养发生了兴趣,并开始探索从未授粉子房诱导孤雌生殖,从而开辟了产生单倍体植株的另一条途径。1969年 Nitsch等在水稻上进行了尝试,并得到了植株,但这些植株是属于二倍体和四倍体的。1971年 Uchimiya等从未授粉玉米子房培养中获得了愈伤组织和分化的不定根,但也不是单倍体。直到 1976年 San Noeum才在未授粉的大麦子房培养中首次获得了单倍体植株。以后相继在大麦、烟草、小麦、向日葵、水稻、玉米、百合、青稞、荞麦、白魔芋和杨树等数十种植物上获得了单倍体植株(孔凡伦等,1990)。在子房培养条件下,有人还对雌配子体发育过程进行了胚胎学和细胞学研究,并取得了较好的结果。

1. 材料的选择

子房培养也和其它培养一样存在选材的问题,子房培养的材料选择主要要考虑两个方面的问题。

⑴ 品种间的差异

在水稻、小麦、大麦、烟草和向日葵等很多植物的子房培养中都表明,不同植物及同一植物不同品种间诱导产生单倍体植株的频率有明显差异。如水稻同是 F_1 未授粉子房培养,其不同组合间诱导频率相差可达好几倍。大麦中也是如此,诱导频率高的品种其诱导率可达 9.15%,而低的只有 2.38%,有的甚至不能诱导产生单倍体。由此可见,子房培养的成功与否与植物的基因型存在密切关系。

⑵ 胚囊发育时期

子房培养是否能够成功,除了选择适宜的基因型外,其胚囊 (embryo sac) 所处的发育时期对胚状体的诱导频率也起着关键性的作用。所以,选择合适的时期进行未授粉子房培养是至关重要的。对已获得较高比例的孤雌生殖单倍体植株的植物分析表明,未授粉子房培养以选择胚囊接近成熟时期的子房为外植体比较容易成功。大麦子房培养试验证明,八核胚囊和成熟胚囊期的子房培养具有较高的诱导频率。由于胚囊的分离和观察都十分麻烦,因此,在实际工作中通常是根据胚囊发育与开花的其它习性和形态标志等的相关性来确定的,如距离开花的天数,一般是开花前两天,还有花粉与胚囊发育的相关性等。大麦胚囊发育阶段与花粉发育时期的相互关系见表 4.10。

表 4.10 大麦胚囊发育时期与花粉发育时期的相关性

花粉发育时期	胚囊发育时期
单核中期	大孢子四分体
单核靠边期	单核至四核胚囊
二核花粉期	八核胚囊
三核花粉期	成熟胚囊

2. 培养基

⑴ 基本培养基

不同培养基对于子房培养产生愈伤组织的诱导频率具有直接影响。比较常用的基本培养基是 N6、BN、MS及改良 MS (附加 VB_1 4mg/L)。禾本科作物以 N6培养基较常用,其它植物则多用 MS和 BN。在百合未授粉子房培养中发现,用改良的 MS为基本培养基比用其它培养基的愈伤组织诱导频率要高出两倍。

⑵ 植物激素的影响

多数试验表明,未授粉子房培养必须加入适宜种类和浓度的外源激素。但不同植物所要求的激素种类和配比各不相同。由此说明,激素的调节作用是一个复杂的问题,必须经过试验确定后才能使用。如百合未授粉子房培养:2,4-D单独使用诱导频率为 18.87%,2,4-D+6-BA诱导频率为 33.73%,2,4-D+KT诱导频率为 47.76%。荞麦未授粉子房培养:2,4-D单独使用诱导频率为 7.6%,2,4-D+KT诱导频率为 1.8%。

⑶ 蔗糖浓度

在未授粉子房培养中,所使用的蔗糖浓度多在 3% ~10%之间,因不同植物材料而异。一般是诱导培养阶段蔗糖浓度要高一些,分化培养时蔗糖浓度要低一些。在杨树、小麦等未授粉子房培养中均发现,较高浓度的蔗糖有抑制体细胞愈伤组织增生而有助于雌配子体进一步发育的作用。

3. 接种方式

因为子房壁与花药不同,营养物质的通透性比较差,所以,子房培养时应采用适于营养物质吸收的接种方式。在大麦未授粉子房的培养中,花柄直插入培养基培养的诱导频率是子房平放于培养基培养的 7倍,证明通过花柄输导系统吸收养料对提高诱导频率起着重要作用。特别是

幼小子房的培养更是如此。但目前这方面的进一步研究还较少,其机制尚不清楚。

4. 单倍体的来源和发育途径

由未授粉子房培养产生单倍体植株的来源和发育途径是多种多样的。在水稻、小麦、向日葵、百合和烟草等的子房培养中,都进行了胚胎学观察。

⑴ 助细胞或胚囊的无配子生殖产生单倍体

在水稻的未受精子房培养中发现,其单倍体是由助细胞和胚囊的细胞无配子生殖产生的。开始产生两个原胚细胞,由它发育成胚状体。有些胚状体具有明显的胚柄,有的无胚柄。有些原胚细胞经过多次分裂产生愈伤组织,再由愈伤组织分化形成芽和根,最后形成小植株。

⑵ 卵细胞、助细胞和反足细胞发育产生单倍体

在大麦和烟草未授粉子房培养中观察到,卵细胞(egg cell)、助细胞(synergid cell)和反足细胞(antipodal cell)都可以启动脱分化产生原胚细胞,而且在一个胚囊里常可以见到不同来源的胚状体。由卵细胞来源的胚状体产生的再生植株最好。

⑶ 非正常发育的大孢子四分体产生单倍体

百合未授粉子房培养中,单倍体植株来源于非正常发育的大孢子四分体。由大孢子母细胞非正常发育,经减数分裂形成的大孢子母细胞继续分裂,形成胚性细胞团,进而形成愈伤组织或胚状体,最后分化形成单倍体植株。

需要说明的是,通过子房培养产生的单倍体与花药培养产生的单倍体一样具有器官变小,生活力下降和高度不育等特性。但在水稻中发现,通过子房产生的单倍体的白化苗比花药植株的白化苗比例要低得多,这在实践应用上是很有意义的。

三、被子植物胚乳培养

1. 概况

胚乳培养的最早研究始于1933年,Lampe和Mills首例进行了玉米胚乳培养。胚乳培养的研究主要集中于以下一些问题的探讨:在离体培养条件下,胚乳细胞是否与其它体细胞和花粉一样,具有全能性而再生植株;大多数被子植物的胚乳是三倍体,能否通过胚乳培养获得三倍体植株而达到无籽结实;通过胚乳培养技术,探索改良农、林及园艺植物三倍体育种技术的可能性;研究离体培养条件下胚和胚乳的关系。

到目前为止,已有40多种植物的胚乳进行了培养,其中苹果、柚、橙、檀香、枸杞、猕猴桃、玉米、大麦、小黑麦、水稻、马铃薯、梨和核桃等的胚乳培养得到了再生植株。还有其它一些植物通过胚乳培养分化出了芽、根、叶等或得到愈伤组织。在获得胚乳再生植株的植物中,猕猴桃、枸杞的再生植株已移栽成活并在田间开花结果,这在胚乳培养中可以说是一个很大的突破。它不仅为胚乳培养技术用于育种实践提供了可能,也为胚乳培养再生植株的遗传学研究等积累了有益的资料。

染色体数目分析表明,胚乳培养的愈伤组织及再生植株的染色体变化很大,倍性混乱在胚乳培养中是较为普遍的现象。它们除了三倍体、多倍体以外,多数看来是由多种倍性细胞所组成的嵌合体。如苹果"金冠"和"红玉"的胚乳植株,其根尖染色体数分别为32～48和27～58左右(栽培苹果的2n=34),其中多于35条染色体的非整倍体细胞十分普遍,而真正的三倍体细胞却很少。在大麦胚乳培养植株的根尖染色体观察中看到,其染色体数目可以从1倍到4倍,另外还

有许多具有 6、8、11、12和 13条染色体的非整倍体细胞。这些现象在玉米、巴豆、桃和猕猴桃等植物的胚乳培养中也观察到。这些染色体变异,对于以获得三倍体植株为目的胚乳培养来讲是不利的。但从另一个角度来说,胚乳培养可能比其它培养具有更广泛的变异性,从而为植物育种和遗传研究提供了更广泛的材料。所以探讨胚乳培养这一课题,无论在理论上还是在实践中均具有很大意义。

2. 植物胚乳的发育特性

植物胚乳可以分为两大类:被子植物胚乳和裸子植物胚乳。裸子植物很特殊,它的胚乳在受精前就已形成。裸子植物的胚乳为配子体的一部分,由大孢子直接分裂发育而成,因此它是单倍体组织。被子植物胚乳是双受精的产物,它由 2个极核 (polar nucleus) 和 1个雄配子融合形成,在染色体倍性上它属于三倍体组织。所以裸子植物的胚乳与被子植物的胚乳有着本质的区别。

被子植物胚乳的发育与植物其它组织比较起来具有其特殊性,根据其发育初期是否形成细胞壁,我们可以把胚乳发育分为 3种类型:核型 (nuclear type)、细胞型 (cellular type) 和沼生目型 (helobial type)。

(1) 核型胚乳

胚乳最初发育经过一段游离核阶段,绝大多数被子植物的胚乳属于核型胚乳。核型胚乳的发育特点是初生胚乳核第一次分裂后,继续进行几次或多次核分裂而不形成细胞壁,许多核以游离的形式共存于 1个细胞质中,以后才开始形成细胞壁而变成真正意义上的胚乳细胞。游离核阶段的细胞核数因植物不同而异 (表 4.11)。

表 4.11 几种植物游离核数比较

植物类型	形成细胞壁时的游离核数
咖啡属	4核
还阳参属	8核 ~16核
小麦	100核左右
报春花、芒果、苹果、柑橘	几百核左右

(引自胡适宜,1982)

在有些植物中还观察到游离胚乳核的多倍化现象,可能是由于胚乳核的融合产生的,这可能就是胚乳培养中除了三倍体细胞外还有多倍体细胞现象的根本原因。

(2) 细胞型胚乳

和核型胚乳不同,细胞型胚乳的发育不经过游离核阶段而按正常的细胞分裂方式进行。胚乳初生核第一次分裂后即形成两个子细胞,以后每次分裂都形成细胞壁。某些合瓣花植物,如烟草、芝麻及番茄等属于此类。

(3) 沼生目型胚乳

沼生目型胚乳是核型与细胞型之间的中间型。初生胚乳核第一次分裂为细胞型,形成两室 (二细胞),靠珠孔 (micropyle) 的一个细胞大,靠合点 (chalaza) 的一个细胞小。然后两个细胞中的核进行游离核分裂,珠孔一端的分裂快,合点一端的分裂慢。以后珠孔端形成胚乳细胞,而合点端的胚乳核慢慢退化。只有单子叶植物中的某些类群的胚乳属于这一类型。

在植物界,禾本科植物、蓖麻、番茄和荞麦等胚乳细胞同胚一起发育形成储藏组织。另一些

植物如豆类、瓜类、油菜和柑橘等,其胚乳发育到一定阶段后被正在发育的胚所吸收,胚的子叶代替胚乳成为储藏组织。

3. 影响胚乳培养的因素

胚乳是一种独特的组织,在被子植物中它是双受精的产物,在倍性上属于三倍体。培养胚乳的首要目的就是为了直接获得三倍体植株。胚乳细胞属于薄壁细胞,虽处于未分化状态,但它与分生组织的细胞有着本质的不同,是一种特化了的薄壁细胞,因此其培养难度远比其它器官要大。虽然目前已有数十种植物胚乳培养成功,但与其它培养类型比较起来,无论在技术的成熟性或是研究深度上都要滞后一些,真正要用于实际育种或其它研究中,还有待于今后更深入的研究。这里我们仅就有关技术问题作一些简要介绍。

⑴ 胚乳的发育时期

各种植物胚乳培养的试验证明,游离胚乳核时期和成熟胚乳时期均不适合进行培养,只有当胚乳处于细胞形成期并仍保持旺盛的分生能力时进行培养才有可能成功。例如,玉米在受精后8～12 d的胚乳适合离体培养,不足 8 d或超过 12 d的胚乳培养则毫无培养反应。发育细胞学观察表明,玉米游离核胚乳在受精后 3～5 d即变成小细胞,直到第 8 d仍保持旺盛的分生能力,以后只有外层胚乳细胞继续分裂,到受精后 22 d停止有丝分裂。

几种植物胚乳培养的最佳时间 (授粉后天数) 列举如下:大麦,10～12 d;黄瓜,7～16 d;小黑麦,7～14 d。

对于胚乳在种子发育过程中被吸收而消失的一类植物来说,掌握胚乳的发育动态对于胚乳培养更是一个关键。王大元 (1978) 在培养柚的胚乳时观察到,在重庆北碚的自然条件下,柚的胚乳在 6月底至 7月初仍为游离核,只有部分胚乳细胞形成,此时胚为心形期;到 7月下旬胚乳才从游离核完全转变成胚乳细胞,而到 7月底胚乳很快解体。因此,在当地 7月下旬的胚乳适合离体培养。

⑵ 基因型

胚乳培养成功与否,基因型也是一个重要的因素。王大元 (1978) 在进行柑橘类的胚乳培养试验中,最初的目的是为了获得三倍体的无籽金柑。他们试验了金柑、甜橙和柚等多个品种的胚乳,其中只有北碚柚的胚乳培养获得再生植株。刘淑琼和刘佳琪 (1980) 在进行桃的胚乳培养研究中,所用桃品种包括“阿木斯丁”、“早生水蜜”、“大久保”、“白风”和“晚黄金”等品种,其中只有“大久保”的胚乳培养获得了胚状体。

⑶ 培养条件

胚乳培养一般采用 White和 MS基本培养基附加一些有机成分和激素。早期的培养多采用 White培养基,而现在使用 MS培养基较多。胚乳培养需要附加水解酪蛋白和酵母提取物。在诱导培养期间,一般需要较高浓度的生长素,分化培养时则需要较高浓度的细胞分裂素。

胚乳培养对 pH的要求较高,不同植物的适宜 pH不同。如玉米以 pH 6.1～7.0为宜,而蓖麻则只需要 pH 5。所以,在培养前必须对所培养植物胚乳适宜的 pH了解清楚。一般来讲,培养的温度和光照与其它培养类型一致。

⑷ 胚因子

刘淑琼 (1980) 在进行桃的胚乳培养中发现,胚对胚乳的培养有一定影响,即所谓的胚因子影响。在他们的试验中,接种方法分为 3种:一是胚乳带胚;二是只取胚乳;三是珠心端胚乳和合

点分开。接种胚乳培养 20～30 d以后形成愈伤组织,其中带胚的胚乳出愈率高达 95%。但在柑橘胚乳培养中未发现胚因子的作用。

4. 胚乳培养的形态发生

(1) 愈伤组织形成

最适发育时期的胚乳在离体培养条件下经过一定时间可形成愈伤组织。蓖麻胚乳在培养 10 d后形成愈伤组织,苹果为 8～10 d,桃为 20～30 d,大麦为 10～12 d,小黑麦杂种胚乳为 7 d,柑橘为 20 d。

胚乳愈伤组织的形成有几种情况。毋锡金 (1979) 在苹果胚乳培养中观察到,接种的胚乳 8～10 d后开始膨大,胚乳合点端表层及其下面 2～5层细胞含有浓稠的细胞质和大的核,由此胚性细胞产生愈伤组织。玉米受精后 12 d的胚乳其外围是一层分生细胞,在离体培养条件下这层细胞开始分裂,在胚乳组织的外围形成一层分裂活跃的细胞,它们是愈伤组织的起源细胞。

王敬驹等 (1982) 进行小黑麦杂种胚乳培养实验时观察到,培养一周后有相当多的细胞死亡,剩下的活细胞出现两种情况:一种细胞向正常的胚乳储藏细胞方向发育,细胞增大,淀粉粒迅速发育,最后巨大的淀粉颗粒充满细胞,细胞体积为原始细胞的 5～10倍。这种细胞不能形成愈伤组织。另一类细胞的细胞核体积增大,细胞质变浓,原有淀粉小颗粒消失,它成为胚乳愈伤组织的原始细胞,经进一步的分裂增殖形成细胞团和愈伤组织。

(2) 器官发生

胚乳形成芽有两种途径:一是先诱导愈伤组织,然后从愈伤组织中分化出芽;二是胚乳组织不形成愈伤组织,直接形成芽。

现有研究资料表明,芽的形成途径首先与培养基有关。如果培养基中的生长素浓度较高,则胚乳先形成愈伤组织,再分化芽。如果培养基中的激动素和细胞分裂素浓度较高或不含生长素,则可能直接产生芽。但一般来讲,直接分化芽的频率较低,培养效率不高。其次是胚乳的接种方式。有人将大麦胚乳分割成两半,切口向培养基接种的容易直接形成芽,切口背对培养基的则很少分化芽。此外,桂耀林 (1982) 研究了中华猕猴桃胚乳培养中胚状体的发生。在含有玉米素和水解酪蛋白的 MS培养基上,猕猴桃胚乳细胞首先形成愈伤组织,然后在愈伤组织表面形成许多胚状体,再由胚状体形成植株。但在含生长素的培养基上不能形成胚状体。

(3) 影响胚乳形态发生的因素

胚乳离体培养技术的研究目前还处于发展阶段。诱导产生愈伤组织和形成植株的植物种类还很有限,胚乳培养的器官发生比较困难也阻碍了胚乳培养的发展。胚乳培养所面临的问题,一方面与培养条件的掌握和培养基的配方研究不够有关,另一方面对胚乳本身的特性了解不够也是重要原因。

胚乳是胚正常发育和种子发芽所必需的一种营养物质,胚乳细胞是起储藏作用的特化细胞。研究者在不同植物中观察到,在体内发育过程中,胚乳细胞发生不正常分裂和核融合,因而造成基因不平衡和染色体畸变现象。在胚乳细胞离体培养情况下,染色体的异常现象也时有发生。如毋锡金 (1979) 在观察苹果胚乳培养时发现染色体极不稳定,胚乳愈伤组织只有 3% 的为 3n,其它胚乳细胞为 1～9倍体及非整倍体,同时还发现胚乳核融合现象。由于苹果胚乳细胞体内体外均不正常,因此器官发生比较困难。

Boyer等 (1974) 观察了玉米继代培养 3年以上的胚乳愈伤组织细胞的染色体数,除了 3x =

30和 6x＝60的细胞外，其它细胞染色体数变动在 21～200之间。刘淑琼 (1980) 在观察桃胚乳培养形成胚状体时，也发现胚状体根尖细胞染色体数为 8、15、16和 24的不稳定状况。

思考题

1. 利用茎尖分生组织培养脱除植物病毒的原理。
2. 哪些因素影响茎尖培养的脱毒效果？
3. 对于生根困难的植物脱毒在培养方式上采用哪些措施？
4. 离体繁殖中芽的增殖方式有哪些？各有何特点？
5. 为什么用于繁殖的组培技术要尽量避免使用外源激素？
6. 通过离体培养获得单倍体的途径有哪些？
7. 花药培养中如何选择外植体？
8. 花药培养与花粉培养有什么不同？
9. 花药培养过程中花药为什么要经过低温处理？
10. 花药培养时为什么要用较高浓度蔗糖和较低浓度激素？
11. 花培中再生植株的形成途径与再生植株倍性有何关系？
12. 幼胚培养的关键技术是什么？
13. 幼胚培养时胚的发育方式有哪几种？各有何特点？
14. 未授粉胚珠子房培养与授粉后胚珠子房培养有何不同？
15. 在实际操作中如何确定胚囊的发育时期？
16. 植物胚乳有哪些类型？

第五章

植物细胞培养及次生代谢产物生产

植物细胞培养（plant cell culture）是指在离体条件下对植物单个细胞或小的细胞团进行培养使其增殖的技术。由于研究的目的不同，细胞培养有多种不同的培养方法。根据培养规模不同，可以有小规模培养和大批量培养；根据培养方式不同可以有悬浮培养、平板培养、看护培养；根据要求的产物不同可以有用于诱变的细胞培养和用于生产次生产物的细胞培养。综合这些培养类型和方式，本章主要介绍细胞培养的基本方法：细胞悬浮培养技术，用于某些研究所需要的单细胞培养技术，用于次生产物生产的细胞大量培养技术。细胞大量培养技术主要重点介绍通过生物学途径提高次生产物生产率的方法。

第一节　悬浮培养

细胞悬浮培养（cell suspension culture）是指将单个游离细胞或小细胞团在液体培养基中进行培养增殖的技术。悬浮培养是一种十分有用的实验体系，在液体状态下便于细胞和营养物质的充分接触和交换，细胞状态可以相对保持一致，因此有利于在细胞水平上进行各种遗传操作和生理生化活动的研究，同时为植物细胞的大规模培养提供前期技术基础。

简单地讲，悬浮培养首先必须获得大量的细胞。在早期的细胞培养中，多采用叶肉细胞和根尖细胞作为细胞来源，其细胞分离方法可以采用机械分离和酶分离。直接分离来自植物个体的细胞，由于分化程度的差异，细胞的生理一致性较差，影响培养效果。因而现在建立细胞悬浮培养体系，一般采用愈伤组织作为起始细胞来源。以愈伤组织为起始细胞的悬浮培养技术，其关键主要包括愈伤组织诱导，悬浮系的建立与继代培养及细胞生长状态调控等几个环节。

一、愈伤组织诱导

以愈伤组织作为细胞悬浮培养的细胞来源，首先必须诱导出适宜的愈伤组织。用于建立悬浮系的愈伤组织必须有较好的松散性，使之在悬浮培养的起始阶段细胞容易打散。同时，愈伤组织还必须具备较强的增殖和再生能力。诱导符合这些要求的愈伤组织，首先，必须选择适宜的植物外植体材料。研究表明，胚、胚轴、子叶是最常使用的外植体，特别是幼胚。因为以胚为外植体建立的愈伤组织，其细胞生活力强，增殖速度快，且组织分化与器官再生能力强。其次，培养基的附加成分对建立疏松易散的愈伤组织具有较大的影响，特别是生长素的浓度至关重要。在大多数情况下，2,4－D常作为起始培养基的生长素，且使用浓度较高。但由于植物种类和外植体类型存在一些差异，具体浓度应通过预备实验确定。除了生长素外，配合一定浓度的细胞分裂素也是十分必要的。常用的细胞分裂素一般为 BA。有时，为了使愈伤组织具有良好的生理状态，还

需附加一定浓度的水解酪蛋白、脯氨酸、谷氨酰胺等有机物质。

除了培养基外,愈伤组织培养阶段必须进行必要的选择和继代,因为一般愈伤组织的细胞并不是均匀一致的,直接由外植体诱导的愈伤组织,若不经过继代则很难获得均匀一致的疏松性。只有在继代培养中不断选择那些疏松性好、细胞状态好的细胞不断继代培养,才能获得大量均匀一致、疏松易碎、适合于建立悬浮细胞系的愈伤组织。

二、悬浮系的建立与继代培养

开始进行悬浮培养时,先取一定量的愈伤组织放入盛有液体培养基的三角瓶中。一般采用150 ml或 250 ml的三角瓶,每瓶装 30 ml或 70 ml培养基,按每克鲜重 10 ml培养基的比例接种。接种后的三角瓶置于 120 r/m的摇床上,在 25℃条件下黑暗培养。如果愈伤组织不易分散,可事先用镊子轻轻将其拨碎,但应尽量避免损伤。也可以在培养基中加入 0.1%的果胶酶,培养 1 d后再转入不含果胶酶的培养基中培养。在培养初期,悬浮细胞培养物可能呈现黏稠状,影响细胞生长,因此每隔 3 d左右要更换 1次新鲜培养基。连续继代培养一段时间后,这种情况可自行消失。

悬浮细胞系建立以后,经过一段时间的培养,细胞开始进行生长和分裂,培养体系中的细胞数量、细胞体积和细胞状态均发生连续的变化。为了保持悬浮细胞一直处于一个相对稳定的良好状态下,一般每隔 1～2周甚至更短的时间就要继代 1次。由于植物细胞具有较强的团聚性,所以培养中小的细胞团不断长成较大的细胞团,且细胞间的状态也可能不尽一致。因此每次继代时均要进行选择,筛选细胞生活力好的细胞继代,淘汰过大和生理状态不好的细胞和细胞团。筛选方法一般采用蔗糖梯度离心法,有时为了简便也可采用过滤法。继代培养时,如果继代时间为 1周,一般按原悬浮液与新鲜培养基 1∶4的比例混合,继代时间为 2周则可用 1∶10的比例 (张自立和俞新大,1990),但具体接种量还需根据继代时的细胞密度确定。悬浮细胞系稳定以后,继代培养中的振荡频率可适当降低,一般为 80 r/m。

一个成功的悬浮细胞培养体系必须满足 3个基本条件。其一,悬浮培养物分散性良好,细胞团较小,一般在 30～50个细胞以下。在实际培养中很少有完全由单细胞组成的植物细胞悬浮系。其二,均一性好,细胞形状和细胞团大小大致相同,悬浮系外观为大小均一的小颗粒,培养基清澈透亮,细胞色泽呈鲜艳的乳白或淡黄色。其三,细胞生长迅速,悬浮细胞的生长量一般 2～3 d甚至更短时间便可增加 1倍。

三、悬浮细胞的生长动态

除了大批量培养采用的一些特殊培养体系外,基本的悬浮培养体系均是将细胞分散在一定容积的培养液中进行培养,在一个培养周期中间不添加培养基。在这种培养体系中,除了气体和挥发性物质与外界有一定交换外,基本是处于封闭状态。当一种营养物质耗尽时,细胞即停止生长。在这种悬浮培养系统中,细胞数量随着培养时间的变化,其扩增生长呈 S形曲线 (图 5.1)。在细胞接种最初的时间内细胞很少分裂,经过一个延迟期 (lag phase),然后进入指数生长期 (exponential growth phase) 和细胞迅速增殖的直线生长期 (linear growth phase),接着是细胞增殖减慢的减缓期 (progressive decelerational phase) 和停止生长的静止期 (stationary phase)。静止期的细胞数量和质量均会下降,如果继代不及时,长期处于停止期的细胞往往会出现死亡和生活力

下降,从而影响整个悬浮细胞系的状态。因此,在通常情况下,当细胞生长进入减缓期时就要及时继代。

尽管在同一个培养周期中细胞增长动态均表现出上述规律,但一个周期所经历的时间长短则因植物种类和起始培养细胞的密度不同而有较大差异。例如,在接种细胞密度均为 1×10^5/ml时,烟草一般是 10 d,而蔷薇细胞培养周期是 12 d。接种初期的细胞密度过低往往使延迟期加长。因此,根据培养目的的不同,悬浮细胞的起始密度一般可在每毫升 0.5×10^5 ~ 2.5×10^5 个细胞间进行调整。如只是一般继代培养,则可适当选择低密度接种,以延长培养周期,减少继代培养的操作。但如果希望在较短时间内获得大量活跃生长的细胞,则可适当提高接种密度,这样可缩短继代培养时间。

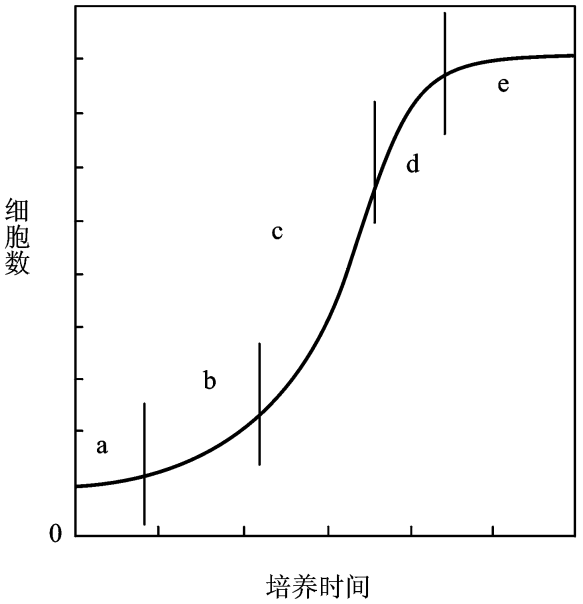


图 5.1　悬浮细胞在一个培养周期中细胞增长动态
a. 延迟期 ;b. 指数生长期 ;c. 直线生长期 ;d. 减缓期 ;e. 停止期

在不同植物的细胞培养中,所使用的培养基通常有一定差异,需通过实验进行筛选。在实际应用中,还需要根据特定的植物细胞和培养基对一些基本的技术参数进行选择,如最低起始密度、最大生长速率、每个培养周期所经历的天数等,这些均需在悬浮细胞体系建立初期进行测定。

起始密度通常通过细胞计数的方法确定。

生长速率 (p) 一般通过不同时间细胞密度 (x) 的自然对数与起始密度 (x_0) 的自然对数之差与培养时间 (t) 的比来衡量。

$$p=(\ln x-\ln x_0)/t$$

也可以通过单位体积的细胞重量测定细胞生长情况。细胞重量采用鲜重和干重来衡量。一般鲜重只能反映细胞的生长情况,而干重则在一定程度上反映了细胞质量。鲜重和干重的测定方法比较简单,只需按一定体积取样,经真空过滤后称重即可得到鲜重,然后在 80℃条件下烘干细胞至恒重即可获得细胞干重。

根据不同培养时间的细胞数变化,或细胞重量变化,则可建立该培养体系的基本参数。根据这些参数可绘制出相关曲线,即可为同类植物细胞培养提供技术参考。

四、悬浮培养细胞的同步化

细胞同步化是指同一悬浮培养体系的所有细胞都同时通过细胞周期的某一特定时期。由于植物细胞在悬浮培养中的游离性较差,容易团聚并进入不同程度的分化状态,因此,要达到完全同步化对于植物细胞培养来讲是十分困难的。也正是因为同一培养体系的植物细胞通常并不能处于细胞周期的同一时相,这种差异使悬浮细胞的分裂、代谢以及生理生化状态等更趋复杂化。所以人们一直希望通过一定的技术途径,使同一培养体系中的细胞能保持相对一致的细胞学和生理学状态。然而到目前为止,有关细胞同步化的控制仍无十分有效的技术手段。但通过一些物理和化学处理,可以使细胞同步化状态获得一定程度的改善,实现部分同步化。目前,细胞同

步化的方法大约以下几种。

① 分选法 通过细胞体积大小分级,直接将处于相同周期的细胞进行分选,然后将同一状态的细胞继代培养于同一培养体系中,从而可能保持相同培养体系中的细胞具有较好的一致性。这种方法的优点是操作简单,分选细胞维持了自然生长状态,因而不会有其它处理所带来的对细胞活力的影响。常规的细胞分选是采用梯度离心的方法。细胞在较高渗透压浓度的蔗糖或多聚糖溶液中,由于体积和质量的差异,在离心过程中会在溶液里形成不同的细胞层,处于同一层的细胞在生理状态和细胞周期上均相对一致。将不同层的细胞分别收集在一起接种,即可获得较好的同步化细胞系。Fujimura等在胡萝卜细胞悬浮培养中使用一种多聚糖 Ficoll成功分选细胞,获得了较好的同步化细胞系。他们先将悬浮细胞在附加 0.5 μmol/L 2,4-D的培养基中培养一周,细胞悬浮液先经过 47 μm的尼龙网过滤,而后再经过 31 μm的尼龙网过滤。收集 31 μm网上的细胞和细胞团,加入等体积的培养基使细胞悬浮,然后将此悬浮细胞缓慢加入到含有 10% ~18%的 Ficoll溶液的离心管中,于 180×g离心力条件下离心 5 min,分别收集离心管各细胞层的细胞,用培养基洗涤 2次除去 Ficoll溶液,再分别接种,即获得较好的同步细胞系。以后这一方法被广泛用于同步细胞系的筛选。但是,植物细胞具有团聚性,培养中由于细胞壁的影响使其形状也不甚规则,从而使细胞分选的精细程度较差。目前,流式细胞仪的使用可以大大提高分选效率和精确程度,但由于仪器的昂贵和操作的复杂性的限制,这一技术短期内很难普遍使用。

② 饥饿法 饥饿也是调整细胞同步化的方法之一。在一个培养体系中,如果细胞生长的基本成分丧失,则导致细胞因饥饿而分裂受阻,从而停留在某一分裂时期。当在培养基中加入所缺乏的成分或者将饥饿细胞转入完整培养基中继代培养时,细胞分裂又可重新恢复。饥饿导致的细胞分裂受阻,常常使细胞不能合成 DNA,即不能进入 S期;或细胞分裂不能进行,即不能进入 M期。因此,通过饥饿法可以获得处于 G_1 和 G_2 期的同步化细胞。研究显示,当细胞处于氮饥饿时,通常获得 G_1 期的同步化细胞;当细胞处于磷和碳饥饿时,则通常获得 G_1 和 G_2 期的同步化细胞 (Chawla, 1999)。Smith和 Muscatine (1999) 在进行一种海藻细胞的培养时,通过 N, P同时饥饿处理 50 h,使 50%的细胞处于 G_1 期,解除饥饿后,细胞可立即进入 S期,恢复细胞生长,从而获得了较好的细胞同步化培养体系。

③ 抑制剂法 通过一些 DNA合成抑制剂处理细胞,使细胞滞留在 DNA合成前期,当解除抑制后,即可获得处于同一细胞周期——G_1 期的同步化细胞。常用抑制剂主要有 5-氟脱氧尿苷 (5-fluorodeoxyuridine, FdU) 和羟基尿 (hydroxyurea, HU)。通过抑制剂获得的同步化细胞基本处于同一个细胞周期,在除去抑制剂后可以不进行分选直接培养,因此这是一种简单便利的方法。用羟基尿处理获得同步化细胞的方法在小麦、玉米和西芹等植物细胞培养中均有成功应用。Peres等 (1999) 在玉米细胞悬浮培养中采用羟基尿处理细胞后,大约有 55%的细胞处于 G_1 期,解除抑制后 2 h, 35% ~40%的细胞进入 S期,8~14 h,进入 G_2 期的细胞可达 60% ~70%。

④ 低温处理 冷处理也可以提高培养体系中细胞同步化的程度。Okamura等曾采用此途径使胡萝卜悬浮细胞较好地同步化。梅兴国等 (2001) 采用 6℃低温处理红豆杉细胞,也获得较明显的同步化效果。

需要指出的是,无论何种细胞同步化处理,对细胞本身或多或少都有一定的伤害。如果处理的细胞没有足够的生活力,不仅不能获得理想的同步化效果,还可能造成细胞的大量死亡。因此,在进行细胞同步化处理之前,细胞必须进行充分的活化培养。用于试验的细胞系最好处于对

数生长期,以保证试验的准确性和有效性。

第二节 单细胞培养

悬浮培养是在液体流动的情况下进行的,不能对某一个细胞进行定点观察和分析,也就不能进行定点选择。因此,在进行细胞株(种子细胞)选择以及一些需要对细胞活动跟踪观察的情况下,必须进行真正意义上的单细胞培养(single cell culture)。由于植物细胞的团聚性,要进行植物细胞的单细胞操作是十分困难的。因此,与植物细胞工程的其它领域比较,植物细胞的单细胞培养技术研究显得十分缓慢,目前应用最多的主要是平板培养,其次是看护培养,也有一些真正意义上的单细胞培养技术的探索,如微室培养。

一、细胞平板培养

所谓平板培养(plating culture)是指将一定密度的悬浮细胞接种到一薄层固体培养基中进行培养的技术。因为接种过程实际上是一个琼脂或琼脂糖培养基与细胞悬浮液混合植板的过程,而植板后细胞被包埋在固体培养基中形成一个平板,所以称其为平板培养。细胞平板培养技术首先是 Bergmann在 1960年创建的,由于其具有筛选效率高、筛选量大、操作简单等优点,因而被广泛用于遗传变异,细胞分裂分化及细胞次生代谢物合成的种细胞筛选等各种需要获得单细胞克隆的研究中。

用于单细胞克隆的细胞来源,目前一般采用经过培养的旺盛生长的悬浮细胞系,通过过滤去除大的细胞团,游离单细胞和小细胞团。用于平板培养的细胞团一般每个不能超过 6个细胞,以便尽可能获得真正的单细胞克隆。过滤后的细胞经低速离心,培养基洗涤 2次后,调整密度至 5×10^5/ml左右。将 1份已调整好密度的细胞悬浮液与 4份 35℃的固体培养基充分混合均匀,然后均匀地平铺于培养皿中,植板厚度为 1~2 mm。待植板后的培养基完全凝固后,用石蜡膜将培养皿封严以防止污染。为了获得真正的单细胞系,此时可将培养皿置于倒置显微镜下观察,对应于各个单细胞在培养皿外相应的位置用记号笔做好标记,再将培养皿置于 25℃黑暗条件下培养。一般 3周后部分单细胞即可长出肉眼可见的愈伤组织。平板培养的操作过程如图 5.2所示。

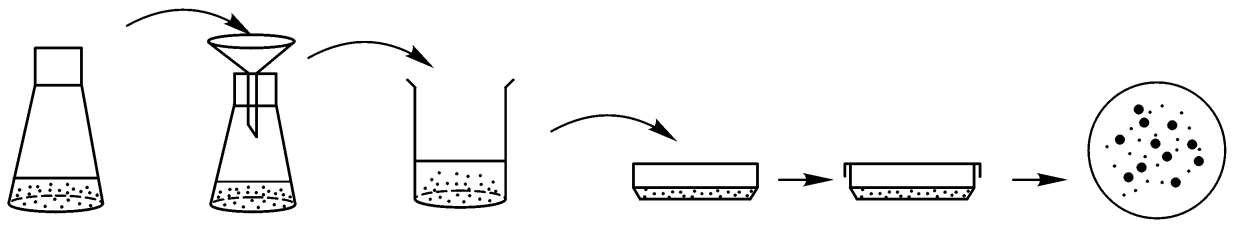


图 5.2 细胞平板培养操作示意图

平板培养的效果一般用植板率来衡量。植板率是能长出细胞团的单细胞在接种单细胞中所占的比例。细胞团的计数方法有两种:一是直接计数;二是感光法(在暗室的红光下将一印相纸放于欲计数的平板培养的培养皿下方,在培养皿上方置一光源,打开光源使培养皿中细胞团印到

相纸上,然后将照片洗出来再计数)。

$$植板率=\frac{每个平板形成的细胞团数}{每个平板接种的细胞总数}\times 100\%$$

平板培养中细胞密度和培养基成分是培养成功与否的关键,而细胞密度与培养基成分又是两个相互依赖的因子。当细胞密度较高时,对培养基成分的要求相对较低;而当细胞密度较低时,对培养基的要求则相对复杂,除了一般的完整培养基外,还需要添加一些含有复合成分的有机物如椰乳、酵母浸出液和水解酪蛋白等。有时,在一些低密度培养中,加入一定浓度的条件培养基(将细胞悬浮培养 2～3 d的培养基离心,其上清液即为简单的条件培养基),也能取得较好效果。需要说明的是,为了获得真正的单细胞克隆,平板培养的细胞密度一般不能太高,以免几个细胞的细胞团长在一起。

二、看护培养

看护培养(nurse culture)技术首先是由 Muir等(1954)设计的。其操作方法是在固体培养基上置入一块活跃生长的愈伤组织,再在愈伤组织上放一小片滤纸,待滤纸湿润后将细胞接种于滤纸上。当培养细胞长出微小细胞团以后,将其直接转至琼脂培养基上让其迅速生长(图 5.3)。愈伤组织和培养细胞可以是来自于同一类植物,也可以来自不同的植物。接种的细胞最初是直接用细胞铲从易碎的愈伤组织中挑取,但这种方法不仅很难获得真正的单细胞,同时也易对细胞造成机械伤害。现在一般多采用上述细胞悬浮液的制备方法,将分散细胞制备成低密度悬浮液(以每滴悬浮液不超过 6个细胞为宜),再在每块滤纸上接种一滴细胞悬浮液。

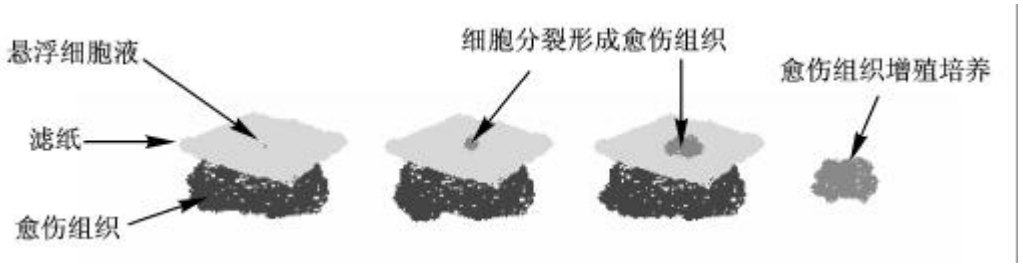


图 5.3　看护培养示意图

三、微室培养

微室培养(micro-chamber culture)是为了进行单细胞活体连续观察而建立的单细胞培养技术。运用这种技术可对单细胞的生长与分化,细胞分裂的全过程及胞质环流的规律等进行活体连续观察。这一方法同样也可用于原生质体培养,以观察细胞壁的再生和细胞分裂过程。因此,微室培养是细胞学研究的优良实验体系。微室培养首先是由 Jones等在 1960年设计的,他们在一张载玻片上用石蜡油作微室的“围墙”,构建成一个细胞生长微室。其做法是:先在载玻片左右两侧各加一滴石蜡油,将盖玻片置于其上作为微室的支柱,再在两端各加一滴石蜡油即构成完整微室。在微室中间接种一滴含单细胞的培养基,然后将第三张盖玻片架在微室两支柱间(图 5.4)。因为石蜡油既可以使细胞与外界隔离防止污染,又具有一定的通气性,所以有利于细胞生长。将接种好的载玻片整体置于一培养皿中,然后在 25 ℃黑暗条件下进行培养,当细胞团长至适当大小时,将其转入新鲜半固体培养基上继续培养。

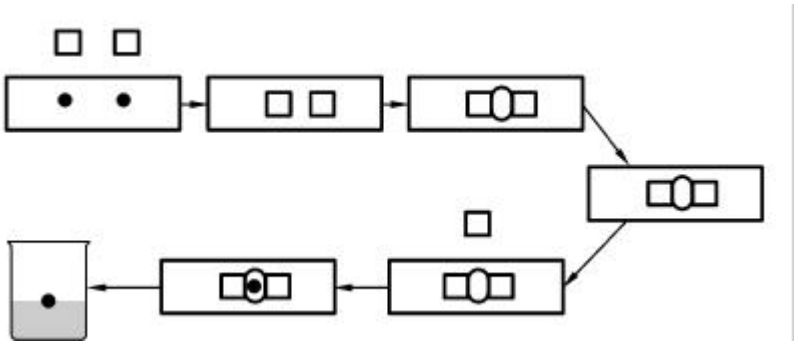


图 5.4 微室培养示意图

自 Jones等的微室培养实验以后,许多学者在他们的方法上进行了进一步改进和完善,在多种植物中获得了单细胞植株。我国的陆文梁 (1983) 在微室设计中采用四环素眼膏代替石蜡油,将洗净的载玻片和盖玻片在酒精火焰上灭菌,冷却后按盖玻片的大小在载玻片的四周涂上四环素眼膏,并在眼膏上放一小段毛细管,将制好的细胞悬浮液滴一小滴在微室中间,盖上盖玻片,轻压到密封,将其置于培养皿中培养,成功地获得了烟草单细胞植物,且较好地解决了污染问题。

四、其它单细胞培养技术

植物细胞在液体中的流动性使之不能固定,其所具有的团聚性和在低密度下难以启动分裂的特性,也使真正的单细胞培养十分困难。为了较好的解决这些问题,在上述培养技术的基础上,一些学者根据不同的研究目的,又改进发展了其它一些培养技术。如在看护培养技术基础上改进的饲养层培养技术,是将饲养细胞先用射线辐射处理,然后将饲养细胞和培养细胞混合植板,经过照射的细胞对于培养细胞起到一个饲养作用,有利于培养细胞的分裂,这一技术在一些低密度原生质体培养中曾成功应用。Horsch等 (1980) 将平板培养与饲养层培养技术相结合,建立了双层滤纸植板培养方法 (图 5.5)。该方法是在培养皿中倒入琼脂培养基,待其凝固后,先将饲养细胞平铺在培养基上,然后在饲养细胞层上平展一张滤纸形成看护层,再将滤纸制成的圆碟置于看护层上,然后将培养细胞置于其中。这一方法不但能使单细胞在饲养层上快速生长,而且以后能将克隆细胞团非常方便地转移至新鲜培养基上继续培养。

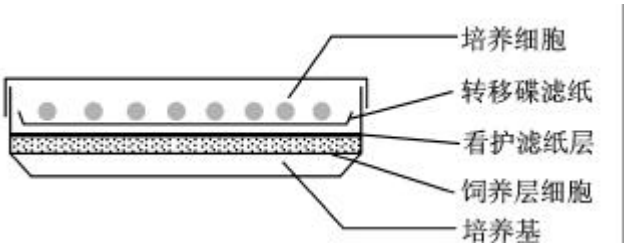


图 5.5 双层滤纸植板培养示意图

第三节 植物细胞的规模培养

一、概述

在植物生物技术中,应用细胞培养系统进行天然产物的生物合成,很可能发展成为广义的化学工业的一个组成部分。长期以来,植物一直是许多化学品的主要资源,特别在制药和食品加工

业中更是不可缺少。据不完全统计,至少有 20%左右的药物是由植物衍生而来的,而且每年都可发现许多植物来源的新化合物。这些不同的物质是分别由不同的植物合成的,其中有些化合物现在还难以用人工合成的方法得到。随着人口的增加和对天然产物需求的增长,自然资源正逐年减少,寻求新的生产天然产物的途径已成为社会发展的需要。因此,通过培养细胞生产特种化合物具有重要的社会、经济和环保意义。

自 20世纪 40年代后期 J Bonner报道了银胶菊植物组织培养物能产生橡胶以来,用组织培养生产有用产物方面的研究已取得了相当大的成就。至今,已研究过近 300种植物培养物中的 400多种有用的化合物,有 30多种化合物在培养物中的积累等于或超过其原植物的含量,如紫草宁含量在培养细胞中可达 12%,小蘗碱可达 13%,人参皂苷可达 7%。植物细胞培养技术已能在 2万 L规模的生物反应器中培养烟草细胞。日本三井石油化学公司在 1977年利用 750 L搅拌式反应器二步法生产紫草细胞,经过不断的技术完善,于 1984年将细胞培养生产的紫草宁色素投入市场,成为药用植物细胞工程的第一个产品化和商业化的例证。近年来,我国在人参、红豆杉、毛地黄和长春花等植物细胞规模培养领域也取得长足进展,有的已进入中试阶段并有一定的产品投放市场。

然而,植物细胞的大规模培养与动物和微生物比较起来,其发展仍然是缓慢的,还有许多技术问题需要进一步研究和解决。从工程的角度讲,必须要进一步研究和开发适宜于植物细胞生长和次生代谢产物生产的生物反应器,建立最佳的控制和调节系统。从细胞生长与培养技术方面讲,必须满足以下 3个条件 培养的细胞在遗传上应是稳定的,以得到产量恒定的产物 细胞生长及生物合成的速度快,在较短的时间内能得到较高产量的终产物 ;代谢产物要在细胞中积累而不被迅速分解,最好能将其释放到培养基中。

二、植物细胞规模化培养体系的建立

植物细胞规模化培养的目的是生产天然产物。因此,培养技术设计与优化的核心是提高天然产物产量。要达到此目的,必须从培养起始细胞开始即选择具有较高生产潜力的细胞系,然后通过一系列技术控制,最终达到尽可能高的天然产物产量。以下是植物细胞规模化培养体系建立的主要技术环节。

1. 种子细胞的选择

植物细胞的遗传基础是天然产物生产的基本影响因素,不同植物产生的天然产物种类之所以不同 (表 5.1),从根本上来说是因为它们具有不同的遗传基础。因此,在确定生产某一种化合物以后,首先必须准确选择那些能够产生目的化合物的植物种类及其品种或单株。由于天然产物一般为次生代谢产物,而植物次生代谢产物的积累具有组织器官特异性,因此,在起始细胞培养时应尽量选择自然状态下产生天然产物的器官、组织为外植体。在起始材料选择后,一般经过前述的细胞培养过程,首先建立培养细胞系,由起始材料建立的细胞系如果目的产物符合要求,即可进入下一环节的生产。

在大多数情况下,来自起始材料的细胞系通常是一个异质细胞群体,细胞间在次生产物积累能力上有很大差异。李志勇等 (2002) 直接利用起始培养细胞,挑选不同细胞团建立了 10个大蒜细胞悬浮系。比较研究显示,不同悬浮细胞系间 SOD 合成能力具有显著差异,合成能力最高的细胞系可达 10.81×10^6 U/L,而最低只有 2.37×10^6 U/L。

表 5.1 部分代表性植物次生产物及其植物资源

工业用途	次生产物	植物资源
医药	可待因（植物碱）	罂粟 (Papaver somniferum)
	薯蓣皂苷配基	三角叶薯蓣 (Dioscorea deltoidea)
	奎宁	金鸡纳树 (Cinchona ledgeriana)
	地高辛（异羟基洋地黄毒苷原）	狭叶毛地黄 (Digitalis lanata)
	莨菪胺	曼陀罗 (Datura strathus)
	长春花碱	长春花 (Catharanthus roseus)
农业化学	除虫菊酯	Chrysanthemum cinerariaefolium
食品，饮料	Tharmatin	Thanumatococcus danielli
化妆品	茉莉油	茉莉花属 (Jasmimum)

（引自 Ramawat和 Merillon, 1999）

高产种子细胞克隆的方法是采用前述的单细胞培养方法，将每个单细胞扩增形成的愈伤组织取一半进行成分含量分析，另一半保留培养。当选择出高产细胞系后，即对相应的愈伤组织进行增殖培养，再进入悬浮培养过程，为进一步规模化培养提供种子细胞。在高产细胞筛选中，为了提高筛选效率，还可根据后续的培养条件适当增加选择压力，也可采用一些突变的方法进行高产突变细胞系筛选。近年来，在红豆杉细胞培养中采用胁迫筛选，已获得一批高产紫杉醇的细胞系。L－Phe（L－苯丙氨酸）是合成紫杉醇的前体，由 L－Phe参与的侧链酯化反应是紫杉醇生物合成中的关键反应之一。因此，从理论上讲，抗 Phe的红豆杉细胞可以大量合成 Phe或者 Phe易于转化为其它物质（包括紫杉醇合成的侧链前体物质），从而可能有利于紫杉醇含量的提高。梅兴国等（2001）通过在培养基中添加 1.6 mmol/L的 L－Phe，筛选出了抗苯丙氨酸红豆杉细胞变异系，抗苯丙氨酸细胞系的紫杉醇含量高于原型细胞系的 3～5倍，并且抗性细胞系的生长速率、细胞活性、pH、胞内可溶性糖含量及褐变强度等均与原型细胞系存在显著差别。刘佳佳等（2001）从银杏实生苗幼茎愈伤组织中分离小细胞团，采用缺氯胁迫法筛选高产黄酮苷的细胞系，高产细胞系培养周期 18 d，生长指数为 4.12，黄酮苷含量为 1.25%，比原愈伤组织的黄酮苷含量显著提高。罗建国和郑光植（1995）采用化学诱变剂 MNNG（N－Methyl－N’－nitro－N－nitrosoguanidine）处理人参细胞，经过筛选，成功获得高产人参寡糖素的细胞系“PGMB－37”，其平均寡糖含量为 14.67%（DW），是供体亲本的 1.5倍。研究表明，单细胞克隆结合诱变和压力筛选，是获得高产目的化合物的有效途径，也是种细胞筛选常用的方法。

2. 种子细胞系的增殖与放大培养

一个规模化培养体系的建立，首先，需要有足够数量的种子细胞，其次，需要有适宜的配套培养体系。而种子细胞的增殖与放大培养，则是建立细胞规模化培养体系的中间环节。在这一环节中，主要目的之一是要获得大量的活跃生长的细胞群体，为细胞大批量生产准备基础材料。种子细胞增殖初期一般采用液体振荡培养，也称摇瓶培养。其摇瓶体积一般从几百毫升到几升逐级放大。在此过程中，应不断检测细胞放大培养中因培养体积的增加所引起的细胞生长特性和目的产物含量的变化情况。当细胞数量增加到一定数量后，应转移至体积较小的生物反应器培养，模拟大规模培养控制条件，为大体积反应器培养提供技术参数。

3. 大规模培养体系的建立

植物细胞大规模培养,根据一个培养周期中是否添加培养基,可分为成批培养、连续培养和半连续培养方式等。

① 成批培养 (batch culture)　成批培养是指在一个培养体积中接种细胞和添加培养基后,中途不再添加培养基也不更换培养基的方式。它事实上就是一种放大的悬浮培养方式,其细胞生长动态与实验室摇瓶培养的一致,成典型的 S型生长曲线。在一个培养周期中,当细胞生长进入缓慢生长达到静止期时,往往是细胞次生代谢产物积累的时期,此时应尽可能维持细胞活性,延长生产周期,以便获得较高的产物积累。为了达到这一目的,近年来又在传统的成批培养的基础上,发展了饲喂批量培养 (feed-batch culture)。其主要改进是:当细胞生长快进入缓慢期时,在培养系统中添加一定量的有利于目的产物合成的培养基,以提高目的产物的积累量。成批培养的优点是培养装置和操作简单,但在培养过程中细胞生长、产物积累,以及培养基的物理状态常常随时间的变化而变化,培养检测十分困难。同时,成批培养的周期较短,一个培养周期后,细胞和培养液同时取出进行目的产物的提取,下一个培养周期必须重新接种种子细胞,因此也增加了培养成本。

② 连续培养 (continuous culture)　在培养过程中,不断向反应器中以一定的流量添加新鲜培养基,同时以相同的流量从系统中取出培养液,从而维持培养系统内在细胞密度、产物浓度以及物理状态上的相对平衡,这种方式即称为连续培养。在连续培养时,添加培养基和取出培养液必须是在接种细胞生长达到一定密度后进行。其细胞恒定量的确定需根据试验,以细胞比生长速率和产物生产量等参数确定。连续培养进入稳定状态后,细胞比生长速率与稀释率相同。连续培养的最大优点是可以延长细胞培养周期,从而延长目的产物的积累时间,增加目的产物产量。同时,由于系统进入稳定状态后,细胞密度、基质及产物浓度等趋于恒定,因而便于对系统的检测。但连续培养装置相对较复杂,对反应器的设计要求较高。

③ 半连续培养 (semi-continuous culture)　这是一种介于成批培养和连续培养之间的培养方式。其基本方法是在完成上述成批培养的一个周期后,只从反应器中取出大部分细胞悬液,保留小部分细胞悬液作为下一培养周期的种子细胞,然后加入新鲜培养基进行培养。这种培养方式可以节省种子细胞培养的成本,同时保留的培养液也有利于细胞分裂的启动。但在大多数情况下,由于保留细胞悬液中细胞状态有较大差异,特别是有些衰老细胞不能及时淘汰,从而会影响下一培养周期细胞生长的一致性。

需要说明的是,由于不同植物细胞的生长和产物代谢存在较大差异,因此,植物细胞培养除了上述基本方式外,常根据不同的要求进行相应改进。如当细胞生长和产物合成需要不同的培养基时,就需要采用两步法建立培养体系,先在细胞生长培养基中培养大批量细胞,当细胞生长至合成产物的阶段后,再将其转入到产物合成培养基中培养,在产物合成阶段又可采用连续培养方式以延长细胞生产时间。

三、生物反应器类型及其特点

植物细胞培养具有周期长、细胞抗剪切能力弱、易团聚等特点。同时,植物细胞规模培养的目的是生产天然产物,而这些天然产物均为细胞次生代谢物。所以,植物细胞培养反应器的设计,不仅要考虑有利于细胞生长,同时还要考虑有利于产物的积累和分离。总体上讲,适合植物细胞培养的反应器应该具有适宜的氧传递、良好的流动性和较低的剪切力。根据不同植物细胞

生长和代谢产物积累的特点，目前已研究设计出多种类型的反应器用于植物细胞培养，已应用的部分植物细胞培养生物反应器种类见表 5.2。

表 5.2 植物细胞培养生物反应器

反应器类型	体积/L	培养植物种类
搅拌式	7, 15	胡萝卜 (D. carota)
搅拌式	20, 15 500	烟草 (N. tabacum)
搅拌式	5 000	长春花 (C. roseus)
螺旋搅拌式	20	五彩苏 (C. blumei)
提升搅拌式	2.5	爱氏马先蒿 (P. elliti)
膜通气搅拌式	20	唐松草 (T. rugosum)
鼓泡式	20, 30, 130	人参 (Ginkgo)
鼓泡式	65, 1 500	烟草 (N. tabacum)
倾斜鼓泡式	1, 10	花菱草 (E. califomica)
外循环气升式	10, 30, 85	长春花 (C. roseus)
导筒气升式	20, 210	狭叶毛地黄 (D. lanata)
转鼓式	1～4	长春花属 (V. rosea)

(引自黄艳等，2001)

1. 搅拌式生物反应器

搅拌式生物反应器 (stirred－tank bioreactor) 是传统的反应器类型。用于植物细胞培养的搅拌式反应器，基本上是在微生物培养使用的机械搅拌式发酵罐的基础上改进而来的。搅拌式反应器具有混合程度高、适应性广、反应器内温度、pH、溶氧及营养液浓度较易控制等优点，因而在大规模培养中被广泛使用。自 1972年 Kato利用 30 L的反应器半连续培养烟草细胞获得尼古丁后，搅拌式生物反应器批量培养植物细胞的研究已有许多报道。然而，由于植物细胞对搅拌时所产生的剪切力的忍耐性差，传统的搅拌式反应器通常易对植物细胞产生伤害。为了适应植物细胞培养的要求，搅拌式反应器对搅拌桨的厚度、形状及搅拌速度等方面已有许多改进 (图 5.6)。总体上看，在搅拌桨较薄而面积较大，或搅拌角较大而搅拌速度较低的情况下，可显著降低剪切力。Tanaka等比较了几种不同类型的搅拌器，结果显示，桨形板搅拌器既能满足植物细胞的溶氧需求，其搅拌剪切力强度又不至于对植物细胞造成伤害。Kreis等在金花小蘗 (Berberis wilsonae) 的细胞培养中，比较了不同搅拌式反应器和气升式反应器中细胞生长与小蘗碱合成的效果。

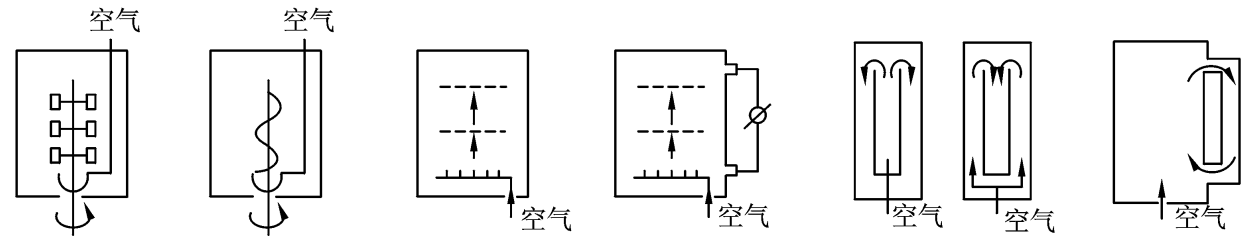


图 5.6 搅拌式和气动式生物反应器示意图
(引自 Endress, 1994)

结果显示,平叶型搅拌器加挡板的反应器,其培养效果与气升式反应器相当,但培养成本可显著降低。目前,利用搅拌式反应器已成功培养了烟草、葡萄、长春花、三角薯蓣、紫草和毛蕊等植物细胞(熊宗贵,1999;黄艳,2001)。有些试验还表明,植物细胞的抗剪切能力,可以在细胞水平上得以驯化增强。Scragg和Allan(1993)等使用3 L搅拌式生物反应器培养苦树(Picrasma quassioides)细胞生产苦木素时发现,经过几年的驯化后,苦树细胞对剪切力的耐性大大提高。

搅拌式反应器除了剪切力的问题外,由于植物细胞生长缓慢,培养周期长(通常为15～20 d),反应器转动的中轴和罐体之间往往容易泄漏而产生污染,这也是尚没有完全解决的问题。

2. 气动式生物反应器

气动式生物反应器利用空气为动力,带动培养容器的液体流动,达到与搅拌相似的混合效果。相对于传统的搅拌式反应器而言,它具有剪切力小、结构简单、避免污染等优点,因而被认为是适宜于植物细胞培养的一类反应器。气动式反应器主要有鼓泡式(bubble column bioreactor)和气升式(airlift bioreactor)两种类型(图5.6)。

鼓泡式生物反应器通过反应器底部的喷嘴及多孔板实现气体分散,促进培养容器的液体流动。其主要优点是没有运动部件,操作不易污染,放大容易,适宜于对剪切力敏感的细胞培养。在紫苏细胞培养中的比较试验说明,鼓泡式反应器比搅拌式反应器有利于细胞生长。但鼓泡式反应器对氧的利用率较低,要增加氧则必须加大通气量。而增加通气量,则因为气流加大,所产生的湍流提高了反应器的剪切力,这样会造成对细胞生长的不利影响。此外,混合不均匀,液体流动与传质性能检测困难也是该反应器的不足(邢建民等,1997;刘志伟等,1999)。

气升式反应器是20世纪70年代开始研制并逐渐使用的生物反应器。它通过空气循环搅拌培养液,不仅可以保证良好的液体流动性,同时还具有较高的氧传递效果,反应器结构和操作也相对比较简单等特点,因而近年来已在植物细胞规模化培养中广泛使用。Fulzele等在20 L的气升式反应器中培养长春花细胞生产阿吗碱,生产率达到每克干细胞315 μg阿吗碱。Smart用85 L的气升式反应器实现了长春花细胞的大体积培养,Folwer又将培养体积放大到100 L。Vienne和Morrison在气升式反应器中进行了长春花细胞的连续培养,稳定时间达到65 d,细胞生长和产物积累均保持良好状态。此外,海巴戟(Morinda citrifolia)、雷公藤(Tripterygium wilfordii)和狭叶毛地黄(Digitalis lanata)等多种植物均在气升式反应器中培养获得良好效果。气升式反应器根据空气循环方式的不同有内循环和外循环两种类型(图5.6)。为了改善其混合均匀性,近年来有研究者将气升式反应器与低速搅拌相结合,弥补了二者的不足,使其更适合植物细胞大规模培养。我国学者刘大陆等发明了一种“气升内错流”式反应器,其优点是可抑制培养过程中的泡沫聚合,强化混合和氧传递,消除容器内局部缺氧现象,有利于植物细胞的长期稳定培养。应用该反应器培养新疆紫草(Arnebia euchroma)细胞,一个周期内细胞生物量每升干重可达12 g,紫草宁含量达10%,是天然植物的2～8倍(刘志伟等,1999;邢建民等,1997)。

3. 固定化细胞生物反应器

通过愈伤组织培养或细胞悬浮培养均能得到所需的次生产物。但是,培养条件下植物细胞的正常代谢,只有与植物体内细胞所处的理化环境相似才能充分实现。虽然愈伤组织的培养具有初步分化或部分分化的结构,较接近整体植物的组织结构,可以积累较多的产物,但是它在形成连续生产能力方面却极为不利。而在生长迅速、高度分散的细胞悬浮培养系统中,细胞所处的

环境既无极性,也无梯度,虽然可以获得迅速增长的生物量,但只有在细胞生长的相对静止期才能积累较多的产物。这些事实说明,细胞只有在慢速生长阶段、或在已经分化或部分分化的组织块或细胞团块中,才能积累较多的次生产物。为了探索在大规模连续培养中解决上述问题的可能性,人们从酶和微生物固定化技术中获得启发,建立了植物细胞固定化培养技术,并设计产生了相应的生物反应器。

植物细胞固定化技术是从 1966年 K. Mosbach, R. Mosbach利用聚丙烯胶将地衣 (Umbilicaria pustulata) 包埋起来开始的。1979年,Brodelius等人第一次把这一技术应用到高等植物细胞培养中。他们用藻酸盐将海巴戟 (Morinda citrifolia)、长春花 (Catharanthus rosaus) 和毛地黄 (Digitalis lanata) 的细胞固定起来,并证实经过包埋固定的 3种植物细胞都得到了理想的结果:巴戟天属植物细胞合成了蒽醌类化合物,长春花属植物细胞能利用结构上相差很远的前体合成吲哚类生物碱,毛地黄植物细胞将毛地黄毒素 (digitoxin) 转化为了地高辛 (digoxin)。此后,这一技术在植物细胞方面的应用发展很快,特别是 Brodelius和 Nilsson (1980) 用各种支持剂对植物细胞作固定化比较试验后,使这一技术得到普及并不断成熟。这一技术的优点在于:可以较容易地控制培养系统的理化环境,从而可以研究特定的代谢途径,并便于调节;细胞位置的固定使其所处的环境类似于在植物体中所处的状态,相互间接触密切,可以形成一定的理化梯度,有利于次生产物的合成;由于细胞固定在支持物上,培养基可以不断更换,可以从培养基中提取产物,免除了培养基中因含有过多的次生产物而对细胞代谢产生的反馈抑制,也由于细胞留在反应器中,新的培养基可以再次利用这些细胞生产次生产物,从而节省了生产细胞所付出的时间和费用;正是由于细胞固定在一定的介质中,并可以从培养基中不断提取产物,因此,它可以进行连续生产。

目前,植物细胞固定化生物反应器有 3种类型 (图 5.7)。一是填充床反应器 (fixed-bed bioreactor)。在此反应器中,细胞固定于支持物表面或内部,支持物颗粒堆叠成床,培养基在床层间流动。由于颗粒间的挤压,常容易造成颗粒破碎使填充床阻塞。同时,混合不均匀、床内氧传递速率低等也是该反应器的主要缺点。二是流化床反应器 (fluid-bed bioreactor)。反应器中利用流质的能量使支持物颗粒处于悬浮状态,混合效果较好。但流体的切变力和颗粒的碰撞常造成颗粒破损使细胞外流,同时流体力学的复杂性也使其放大较困难。三是膜反应器 (membrane bioreactor)。膜固定化方法采用的是具有一定孔径和选择性透性的膜来固定植物细胞,营养物质可通过膜渗透到细胞中,细胞产生的目的产物通过膜释放到培养基中。相对于其它两种固定化反应器,膜反应器具有容易控制、易于放大、产物易分离、简化了下游工艺等优点。但由于膜材料的限制,构建膜反应器的成本较高。

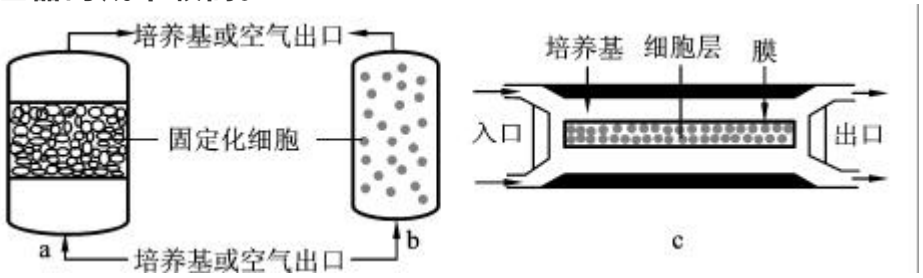


图 5.7 固定化细胞培养反应器示意图
a 填充床;b. 流化床;c. 膜反应器
(引自 Ramawat和 Merillon, 1999)

四、植物细胞规模化培养中的有关工程技术问题

1. 培养中的植物细胞特性

植物细胞的大规模培养技术是在微生物生物反应器技术的基础上建立起来的，但植物细胞培养过程的操作条件与微生物培养具有较大差异。这些差异主要表现在：a. 植物细胞的体积与微生物相比要大得多，其平均直径是微生物细胞的 30～100倍（梅乐和等，1999）。由于重力的影响，植物细胞通常很难均匀混合在培养液中。b. 植物细胞很少以单细胞形式悬浮生长，通常是以直径 2 mm大小的多细胞团方式存在于培养系统中，由于组成细胞团的细胞数差异，容易在培养系统中形成非均匀相的集合细胞团。c. 植物细胞的纤维素细胞壁虽然使细胞具有很强的抗张强度，但却使其抗剪切的能力相当弱。因此，微生物生物反应器中搅拌装置的剪切力很容易损坏植物细胞壁。尽管目前对搅拌式反应器的搅拌桨已有许多改进，同时也有许多专为植物细胞培养设计的其它反应器，但对于处理混合均匀性和低剪切力这对矛盾来说，仍没有十分满意的设计和装置。d. 植物细胞生长速度慢，因此操作周期长，一般均在 3～8周。加之植物细胞培养的培养基营养成分复杂，有利于微生物生长，因此，植物细胞培养中维持无菌环境的难度也较大。

2. 植物细胞培养液的流变特性

目前对植物细胞培养液的流变特性的研究资料很少，人们常常用黏度来描述培养液的流变学特性。培养过程中培养液的黏度变化可由细胞本身和细胞分泌物引起。如烟草培养液在培养过程中的表观黏度，主要是由培养细胞密度的增加引起的。当细胞密度低于 7 g/L时，培养液的黏度基本保持不变，而当细胞密度高于此值时，培养液的黏度即增加。有些培养液黏度则受培养过程中细胞状态的影响。如长春花细胞培养，当细胞密度在 10 g/L时，培养液属于假塑性流体，此时，培养液的黏度依赖于细胞年龄、形态和细胞团的大小。在相同物质浓度下，大细胞团的营养液表观黏度明显大于小细胞团培养液的表观黏度。

3. 植物细胞培养过程中的 O_2 与 CO_2 调节

所有植物细胞都是好气性的，培养过程中需要连续不断地供氧。由于植物细胞对溶氧的变化非常敏感，太高或太低均会对培养过程产生不良的影响，因此，大规模植物细胞培养对供氧和尾气氧的监控十分重要。氧气从气相到细胞表面的传递是植物细胞培养中的一个基本问题。在大多数情况下，氧气的传递与许多因素有关，主要有通气速率、气液界面面积和培养液的流变学特性等。而氧的吸收又与反应器类型、细胞生长速率、培养液酸碱度及细胞密度等有关。通常用体积氧传递系数（K_La，单位时间单位体积氧量）来表示氧的传递。许多研究证明，K_La明显影响植物细胞的生长。如在 4 L的气升式反应器中进行长春花细胞培养，当 K_La在 20/h左右时，细胞生长与次生产物合成均维持在良好状态；而当 K_La高于 25/h时，生物量和次生产物生产率均会明显下降。又如在 15 L的通风式反应器中培养的烟草细胞，当 K_La值低于 5/h时，代谢产物明显受到抑制；而在 K_La值为 5～10/h的范围内，随着 K_La的增加，生物量和代谢产物也呈线性增加。除了供氧量外，培养液的溶氧浓度也会影响植物细胞的生长。有人曾在不同氧浓度下对毛地黄的细胞进行培养，结果显示，当培养基氧浓度从 10% 饱和度上升至 30% 时，细胞的生长速率从 0.15/d上升至 0.20/d；如果溶氧浓度继续上升至 40% 饱和度时，细胞生长速率反而下降至 0.17/d。由此说明，植物细胞培养过程中对氧气的要求是十分严格的。要获得最佳的生物量和次生产物生产率，就必须满足适宜的供氧水平。

与供氧一样，CO_2 对于细胞的生长同样相当重要。有研究表明，植物细胞能非光合地利用 CO_2，如在通气调节过程中，混入 2% ~4% 的 CO_2 即能消除高通气速率对长春花细胞生长和产生代谢产物的不利影响。总之，对于植物细胞规模化培养来讲，在要求培养基充分均匀的同时，O_2 和 CO_2 的浓度必须达到某一平衡状态，才会获得理想的培养效果。

4. 泡沫和表面黏附性

植物细胞大规模培养中易产生大量的泡沫，且覆盖有蛋白质和黏多糖，因而黏性大，细胞极易被包埋其中从循环的培养液中带出来，形成非均相培养，从而影响培养系统的稳定性和生产率。目前通常采用化学和机械两种方式控制泡沫。化学法通常是采用一些表面活性剂以消除泡沫。用于植物细胞培养泡沫控制的化学消泡剂必须满足以下条件：具有较低的表面张力和一定的亲水性，以使消泡剂对气/液界面的分散系数足够大，消泡作用迅速有效；化学性质稳定，在水中的溶解度小，不与次生产物起任何化学反应，对植物细胞无毒害；不影响气体在营养液中的传递和溶解；来源方便，价格便宜。

常用的化学消泡剂包括天然油脂质、高级醇类、聚醚类和硅酮类，实际应用中必须根据所培养的植物种类、次生产物特性等具体选择。

机械消泡不同于化学消泡，它是靠机械装置实现的。机械消泡的优点是勿需在培养液中加入其它物质，从而减少了由于消泡剂所引起的污染和对后续分离工艺的影响。但机械消泡效果常不如化学消泡迅速彻底，同时机械消泡也会增加培养装置的复杂性。

植物细胞规模化培养中的另一个问题是细胞往往会黏附于培养液表面以上的器壁上或电极的挡板上，使这些细胞脱离于培养液而造成细胞死亡。电极上黏附的细胞还会造成电极损坏，通常需要即时去除。培养液表面以上的细胞可采用机械去除，电极上的细胞则去除困难，因此，多采用在电极上涂布硅油以防止细胞黏附。

5. 剪切力对植物细胞的影响

在大规模培养中，植物细胞对剪切力的敏感性一直是力求解决的主要技术问题之一。流体剪切力对植物细胞的影响包括正负两个方面。适当的剪切力可以增加培养系统的通气性，保持良好的混合状态和分散性，从而提高细胞的生物量和增加次生产物的积累。但在细胞能够忍受的剪切力范围内，生物反应器增加剪切力的设计往往比降低剪切力要容易。因此，目前的研究大多集中在剪切力对植物细胞的伤害这一问题上。剪切力对植物细胞的伤害，主要表现在机械损伤，表现为细胞团变小、细胞破损等。由于这些损伤，造成了细胞内含物释放到培养基中，从而改变培养系统的物理特性如 pH、流变特性等，进而影响整个培养系统的细胞生长和产物积累。影响植物细胞的剪切力主要来自搅拌力。在机械搅拌式反应器中，搅拌力取决于搅拌桨的形式和搅拌速度，气动式反应器的剪切力则主要取决于通气速率。

植物细胞对剪切力的敏感性首先是由 Mandel提出的，其后许多研究者在不同植物细胞中对其进行了研究。结果显示，同是植物细胞，甚至同一植物的不同细胞系，它们对剪切力的敏感性均具有一定差异，从而给工程设计带来了复杂性。目前，植物细胞反应器的总体设计原则为提高混合程度和降低剪切力。Merchuk等曾设计出一种可根据不同细胞特性进行精确控制的反应器，但放大后的控制在工程技术上还有一定难度（刘春朝等，1998）。如果在培养条件下对细胞抗剪切能力进行驯化，然后与工程技术相结合，可能会更好地解决这一问题。

第四节　培养细胞的次生代谢及产物积累

一、植物次生代谢产物的主要类型

植物次生代谢的概念是1891年由Kossel明确提出的，现代植物生理学根据代谢活动与细胞生命活动的关系，将植物代谢分为初生代谢和次生代谢。植物初生代谢及其产物是维持细胞生命活动所必需的，初生代谢受阻将直接影响植物的生长与发育。而次生代谢及其产物一般认为并非细胞生命活动所必需。次生代谢产物是一类小分子有机化合物，其分布具有种、属、器官、组织，以及发育阶段的特异性。根据代谢途径和化学结构，植物次生代谢产物可分为酚类化合物、萜类化合物和含氮化合物等主要类型。

1. 酚类化合物

酚类化合物包括黄酮类、醌类和简单酚类。黄酮类化合物是一类以原酮为基础、具有$C_6-C_3-C_6$结构的酚类化合物，其生物合成的前体是苯丙氨酸（Phe）和丙二酸单酰辅酶A（malonyl CoA）。根据B环的连接位置不同，可分为2—苯基衍生物（黄酮、黄酮醇）、3—苯基衍生物（异黄酮）和4—苯基衍生物（新黄酮）。根据其三碳结构的氧化程度，则可分为花色甙类、黄酮类、黄酮醇类及黄烷酮类。许多黄酮类化合物是治疗心血管疾病和高血压的药物成分，异黄酮类往往是植物抗毒素。醌类化合物是由苯式多环芳烃衍生的芳香二氧化合物，按其环系统不同可分为苯醌、萘醌及蒽醌。醌是植物呈现颜色的主要物质基础，有些醌类化合物还具有抗菌、抗癌作用。简单酚类广泛分布于植物的叶片及其它组织中，对植物发育有一定的调节作用，有些酚类化合物是植物抗毒素的重要成分。

2. 萜类化合物

萜类化合物是由异戊二烯单元组成的化合物，在植物体内通过异戊二烯途径产生，广泛分布于各类植物中。目前已知的萜类化合物已超过2万种（陈晓亚，1998）。根据异戊二烯单元及其结构的不同，萜类化合物可分为单萜、倍半萜、二萜、二倍半萜、三萜，以及甾类化合物。单萜和倍半萜是植物挥发油和香料的主要成分，许多倍半萜和二萜化合物也是植保素，有的具有重要的药用价值，如目前抗疟疾的最佳药物青蒿素即是一种倍半萜，抗癌药物紫杉醇则是二萜生物碱。植物体内的三萜皂甙元和甾体皂甙元分别与糖类结合形成三萜皂甙和甾体皂甙，是许多药用有效成分，如人参皂甙和薯蓣皂甙等。

3. 含氮化合物

含氮化合物主要包括生物碱、胺类、非蛋白质氨基酸和生氰苷。生物碱是一类含氮的碱性天然产物，已知的生物碱已达5 500种以上（陈晓亚，1998），主要分布于双子叶植物中。按其植物来源和代谢途径，生物碱可分为真生物碱、伪生物碱和原生物碱。真生物碱和原生物碱均为氨基酸衍生物，但原生物碱没有含氮杂环。伪生物碱来自萜类、嘌呤和甾类物质。许多生物碱是药用有效成分，有些是植物抗毒素。目前对生物合成途径研究得较为清楚的有烟草的烟碱、毒藜碱和吡咯啶生物碱，毛茛科植物的小檗碱，以及曼陀罗属植物的莨菪碱和东莨菪碱。

胺类是NH_3中氢的不同取代产物，根据取代数目可分为伯、仲、叔和季胺4种，通常由氨基

酸脱羧或醛转氨而产生,目前已鉴定结构的胺类化合物约 100种。胺类化合物通常分布于植物的花器官中,有些胺类可调节植物的生长发育。在离体培养中,加入多胺有时可促进离体成花或其它器官的分化。非蛋白氨基酸是不属于植物蛋白质组成成分的氨基酸,已鉴定结构的这类氨基酸达 400多种,多分布于豆科植物中,常有毒。由于其与蛋白质氨基酸类似,因而易被错误地掺入蛋白质,是一类蛋白质拮抗物。生氰苷是由脱羧氨基酸形成的 O-糖苷,氰基来源于 a-碳原子和氨基。生氰苷是植物产生 HCN 的前体,现已鉴定出 30种左右,如苦杏仁苷和亚麻苦苷等。

4. 其它

除了上述三大类次生代谢产物外,植物还产生多炔类和有机酸类次生产物。多炔是植物体内发现的天然炔类,主要分布在菊科和伞形科植物中,现已发现 1 000种左右。有机酸是广泛分布于植物中的次生代谢产物。近年研究表明,某些有机酸参与了植物代谢活动中的信号传递,如茉莉酸和水杨酸。

二、培养条件下的植物细胞次生产物积累的特性

从理论上讲,所有的植物细胞都可以看作是一个有机体,具有构成一个完整植物体的全部遗传信息。在生化特征上,单个细胞也具有生产其亲本植株所能产生的次生产物的遗传基础和生理功能。但是,次生产物在整体植株中的合成往往具有发育阶段、部位或组织特异性,培养条件下的细胞由于脱离了植物体,其次生代谢活动与整体植物相比有一定差异。众多研究显示,离体培养下的植物细胞积累次生代谢产物通常需要细胞处于一定的分化程度。此外,由于次生代谢产物的种类和植物种类的差异,在一个培养周期中,产物积累与细胞生长期的相互关系也不尽相同。充分了解这些特性是调整细胞生长与提高目的产物产量的关键。表 5.3反映了部分植物细胞培养过程中产物积累与细胞生长的关系。

表 5.3 植物细胞生长与次生产物积累的相关性

	培养植物种属	产 物
I 组		对数生长后期积累
	单冠毛菊	花色素苷
	玫瑰	酚醛
	曼陀罗属、莨菪属	托品类生物碱
	穿心莲属	内酯、倍半萜类
	巴戟天属	蒽醌类
II 组		快速生长期积累
	杨属	花色素苷
	胡萝卜属	肉桂酸
III组		与细胞生长平行积累
	长春花属	长春花碱
	烟草属	烟碱
	藜属、商陆属	β-花青苷
	唐松草属	小檗碱

续表

	培养植物种属	产　　物
	薯蓣属	薯蓣皂甙配基
	白屈菜属	血根碱
	药鼠李	蒽醌
Ⅳ组		稳定期积累
	阿米属	visnagin
	Paul's红玫瑰	绿原酸
	紫草	紫草宁

(引自 Endress R, 1994)

根据植物细胞生长和产物合成的关系,可将培养细胞生产次生产物的类型分为 3种:一是生长偶联型,即产物合成与细胞生长呈正比例关系,如长春花属植物中的长春花碱的合成、烟草细胞的烟碱合成、薯蓣属植物中的薯蓣皂甙的合成等;二是中间型,产物仅在细胞生长开始下降时才能合成,细胞处于对数生长时产物不合成,当细胞停止生长时,产物也停止合成,如蒽醌类物质合成的植物细胞,托品类生物碱类合成的植物细胞等属于此类;三是非生长偶联型,即产物只在细胞生长停止后才能合成,如紫草宁的合成。事实上,由于细胞培养过程比较复杂,细胞生长和次生产物的合成很少完全符合上述模式。特别是在较大的细胞群体中,由于细胞生理状态的不同步,细胞生长和产物合成也许分别是细胞群体中部分细胞行为的结果。

三、提高细胞次生产物产量的途径

1. 选择适宜的起始材料

尽管多数植物次生产物在植物中分布广泛,但其含量在不同植物间却有相当大的差别。因此,在建立次生产物生产的细胞系时,首先必须选择能够高效合成目的产物的植物种类。在此前提下,起始培养材料还应考虑器官和组织特异性,通常选取自然状态下能够积累次生产物部位的细胞,这样的细胞经过培养以后常常具有合成目的产物的能力,或比较容易诱导合成目的产物。东北红豆杉幼嫩茎、叶片以及芽 3种外植体的愈伤组织中紫杉醇含量比较显示,以叶片为外植体的愈伤组织,其紫杉醇含量是其它两种外植体形成的愈伤组织的 3倍 (蔡朝晖等, 1995)。在茜草 (Rubia cordifolia) 愈伤组织培养中也发现,来源于叶柄和茎的愈伤组织其蒽醌的积累量比来源于茎尖和叶的愈伤组织高 (Mischenko等, 1999)。

2. 培养基成分的影响

培养基的营养成分一方面要满足植物细胞的生物量增长,另一方面要使细胞能合成和积累次生产物。通常使用的细胞生长培养基主要是为促进细胞生长而设计的,它对次生产物的生产不一定完全合适。一般来说,增加培养基的 N、P和 K的浓度能促进细胞生长,而适当增加糖浓度则有利于次生产物的合成。吴奇君等 (2001) 在红豆杉细胞培养中,在培养第 15 d向培养基中同时加入果糖和前体物质,获得了较高的紫杉醇产物积累。葡萄细胞培养中显示,低氮、高蔗糖浓度有利于酚类化合物积累。成浩等 (1994) 曾对培养基中主要离子浓度对茶愈伤组织生长和儿茶素含量积累的影响进行了较系统的研究,结果表明,培养基硝态氮和氨态氮的比例对愈伤组织生长和儿茶素积累有明显影响,当 NO_3^-/NH_4^+ 的比值在 7:3时,有利于愈伤组织生长。但对于

儿茶素的积累，则以全硝态氮为宜。试验还证明，儿茶素积累对 Ca^{2+} 离子较敏感，Ca^{2+} 离子浓度在 1 mmol/L 时最有利于儿茶素积累，低于或高于这一浓度，儿茶素积累量均下降。K^{+} 对儿茶素的积累有抑制作用，在不含 K^{+} 的培养基中，儿茶素积累量最高，当培养基的 K^{+} 浓度增加到 10 mmol/L 时，儿茶素的含量只有对照的 64%，但在不含 K^{+} 的培养基中细胞生长量降低。由此可见，要获得较好的儿茶素生产效果，其 K^{+} 浓度必须维持在一个相对的平衡点，以保证较好的细胞生长和相对高的儿茶素积累。已有研究表明，因为化合物成分的不同，植物细胞的次生代谢可能需要不同的营养条件，因而需要调节的培养基成分也不尽相同。在许多情况下，维持细胞最大生物量的营养条件可能并不是目的产物积累的最佳营养条件，此时需要通过调整营养成分或培养技术，以获得尽可能高的培养效率。

生长调节物质是培养基的重要成分之一。在植物细胞培养过程中，生长调节剂的种类和浓度对细胞的生长、分化和次生产物的合成起着十分重要的作用。生长素和细胞分裂素有使细胞分裂保持一致的作用，不同类型的生长素对次生产物的合成有着不同的影响。生长调节剂对次生代谢的影响随次生产物的种类不同而有很大变化，因此，对生长调节剂的使用需要严格试验。司徒琳莉和李振山 (2001) 在东北红豆杉细胞培养研究中表明，培养基添加一定浓度的 2,4－D 可以显著提高细胞生长速率，增加细胞生物量，添加适当浓度的 BA 和 KT，则可提高紫杉醇的积累。李华等 (1999) 在滇紫草细胞培养中加入油菜素内酯 (BR)，显著促进了紫草宁的形成。对紫草宁合成的关键酶之一苯丙氨酸裂解酶 (PAL) 活性分析显示，BR 可能通过提高 PAL 活性来促进紫草宁的合成。

3. 前体的应用

在利用培养细胞生产次生产物的过程中，有时细胞培养物往往不能按人们设计的要求获得理想产物，其中一个可能的原因就是缺少合成目的产物所必需的前体 (precursor) 物质，此时如果在培养基中加入外源前体物质，将会使目的产物产量大大提高。因此，在植物细胞培养过程中，选择适当的前体物质是相当重要的。Fett－neto 等 (1994) 研究了不同浓度的苯丙氨酸和苯甲酸对二年生紫杉 (Taxus cuspidata) 细胞生长及紫杉醇产量的影响，证明向培养基中添加有效前体物质能促进紫杉醇及紫杉醇烷类物质的合成和分泌。

植物细胞次生代谢是一个复杂的生理生化过程，对于某一目的产物来讲可能有多种前体物质，而同一种前体物质又可能有多条代谢路径，从而形成不同的代谢产物。因此，添加前体物质必须在充分了解目的产物的代谢途径的前提下，针对其合成的关键生化过程，进行前体物质的添加。事实上要真正做到这一点是十分困难的。此外，多数前体物质对细胞生长本身并不十分有利，因此，前体物质的添加时间也常常影响培养效率。吕东平等 (2001) 在水母雪莲细胞培养中对前体物质不同添加时间的研究显示，在培养 6 d 时，细胞进入快速生长期，此时加入前体物质有利于细胞的生长和黄酮合成。同时，前体物质的浓度对产物合成速率也会有一定影响。一些次生代谢途径中，过量的底物反而会产生反馈抑制。因此，为了提高次生产物的生产效率，在细胞规模化生产前，应对目的产物代谢途径、有效前体及其添加浓度和时间进行全面的试验研究。

4. 激发子的应用

植物细胞次生代谢除了自身的遗传与发育基础外，通常还与诱导因子相关。在一些不良环境或有微生物侵入的情况下，细胞次生代谢活动显著增强。研究显示，由环境刺激引起的细胞代谢及其积累的产物大多也是我们培养细胞的目的产物。因此，人为地合理应用这些诱导因子，就

有可能提高目的产物的产量。这也是近年来植物细胞次生代谢产物生产研究的热点。

激发子（elicitor）也称诱导子，是指能够诱导植物细胞中一个反应，并形成细胞特征性自身防御反应的分子。目前使用的激发子可分为两类：一类是非生物激发子（abiotic elicitor），如辐射、金属离子等。另一类是生物激发子（biotic elicitor），是目前使用较普遍的激发子。生物激发子根据其来源不同又可分为外源性激发子（exogenous elicitor）和内源性激发子（endogenous elicitor）。外源性激发子多来源于微生物，包括经处理的有机体如菌丝，微生物机体浸提物以及由微生物产生的多糖类、蛋白质类以及脂肪酸类物质等。内源激发子是来源于植物本身的物质，如降解细胞壁的酶类、细胞壁碎片、寡聚糖以及其它有机分子等（Akimoto等，1999）。

张荫麟等（1992a）在延胡索植物细胞培养中，以蜜环菌发酵液作激发子，显著促进了原鸦片碱的合成。他们在人参毛状根细胞培养中发现，加入蜜环菌发酵液培养 3～4 d后，细胞丹参酮的含量可提高至接近活体植物细胞的水平。人参和西洋参的愈伤组织培养，在培养基中加入寡糖素有利于细胞生长和皂甙的积累（周立刚等，1992）。利用酵母提取物促进生物碱、黄酮类等次生产物合成也在长春花、葛和茶等多种植物细胞培养中成功应用（宋经元等，1999）。

激发子促进次生产物的积累与其种类和浓度有关。研究显示，不同的激发子可能促进不同的次生产物积累。同时，激发子的适宜浓度对终产物的有效形成也有某些影响。浓度过低不能达到诱导效果，浓度过高则有利于细胞生长。施中东等（1999）在南方红豆杉细胞培养中证明，硝酸柿铵、硝酸银、花生四烯酸、水杨酸以及甲基茉莉酮酸均有促进紫杉醇合成的作用，但其促进的效果有一定差异。在加入激发子后培养 10 d，加入甲基茉莉酮酸的处理其紫杉醇含量比对照可提高 7倍以上，加入花生四烯酸可提高 6.5倍，加入硝酸柿铵和水杨酸的处理可分别提高 5.5倍和 4.5倍，而硝酸盐的处理则只能提高 3倍。从使用浓度分析，5种激发子的最适浓度各不相同，硝酸柿铵以 1.0 mmol/L为适宜浓度，花生四烯酸、甲基茉莉酮酸和水杨酸的适宜浓度为 0.1 mmol/L，硝酸盐的浓度则只能使用到 0.01 mmol/L。水杨酸和硝酸盐 2种激发子对浓度使用尤为严格，当高于适宜浓度时不仅不能促进紫杉醇积累，还会严重影响细胞生长。

5. 培养技术的选择

选择有利于次生产物合成的细胞培养技术是高效生产目的产物的基本前提。这里所指的培养技术是一个综合体系，包括对反应器的选择和对培养方式的选择。培养技术的选择不仅要考虑细胞生长和产物积累的效率，同时还应考虑技术基础和生产成本。就目前的技术基础来讲，固定化培养是植物细胞规模化生产较为理想的系统，在条件允许的情况下，可优先考虑。但由于目前用于固定细胞的材料的限制，使其生产成本较高，因此，在考虑应用该系统大规模生产时，还应考虑目的产物的经济价值和市场状况。

培养基是细胞生长和合成代谢产物的基础。为了同时满足细胞生长和产物合成的需要，通常需要在不同阶段使用不同的培养基，两段培养即是合适的选择。在第一阶段使用适于细胞生长的培养基——生长培养基。当细胞生物量达到次生代谢要求后，进入第二阶段的培养，使用有利于次生代谢物合成的培养基——生产培养基。在大多数情况下，两种培养基在一些附加物质上有较大差别，以长春花细胞培养中激素的使用为例，细胞生长阶段使用生长素类物质 2,4－D，以促进细胞生长，而在生物碱合成的产物生产阶段则使用 BA，以有利于产物合成。同时，在产物生产阶段的培养基中还需添加色氨酸（于荣敏，1999）。

许多研究显示，植物细胞次生产物在培养系统中的积累，有时对产物合成具有反馈抑制，有

的产物分泌到培养基中后还会出现降解。要解决这些问题,最适宜的方法是边合成边回收,由此而产生的两相培养技术是较为理想的技术。两相培养技术主要由培养相和提取相组成,其技术关键是选择合适的提取相。一般来说,提取相的选择目标是具有较大的分离能力,同时对细胞没有毒副作用,不影响产物的化学稳定性。根据分离相的性质,两相培养可分为液 -液系统和液 -固系统。液 -液培养系统中,分离相和培养基的化学性质和比重不同,在系统中形成明显区分的两相,其分离相主要使用液体石蜡、烷类化合物和甘油等。液 -固系统是指提取相以固态形式存在于系统中,主要通过吸附分离目的产物,目前使用的主要有活性炭、硅酸镁载体、沸石、蚕丝以及树脂等。从理论上讲,两相培养不仅可以克服产物的反馈抑制和降解,同时由于能及时分离产物,还可以避免产物对细胞本身的毒害,从而延长细胞的使用时间,达到延长产物合成期的目的。然而,由于分离相材料的性质和加入以后对培养系统理化条件的影响,培养过程中的技术控制更加复杂化,因此,这一技术的应用目前还处于研究开发阶段 (常钰等,2001)。

植物细胞规模化培养生产次生产物是一项具有潜在应用价值的技术。由于工程技术和细胞生物学本身的原因,目前的应用还十分有限。开发新的适宜于植物细胞高效培养的生物反应器仍然是这一技术应用的主要环节之一。同时,从生物学角度看,筛选高产、容易培养的植物细胞系也是至关重要的研究内容。大量研究证明,游离植物细胞从生理特性和可能进入的分化程度来看,与处于组织器官内的细胞具有较大差异。然而,使细胞相对固定和具有良好的分化状态对次生代谢活动的高效性又是十分必要的。目前除了研究细胞固定化技术外,规模化培养组织器官用以生产次生产物,也成为这一技术改进的重要内容。特别是通过发根农杆菌转化、规模化培养一些植物的发状根来生产次生产物,已在人参、丹参、紫草、颠茄和黄芪等植物中进行了探索性研究,并取得良好进展。此外,一些以种子胚为次生代谢器官的植物,其体细胞胚规模化培养用于次生产物的生产,也在少数植物中开展了研究。相信通过工程技术的改进和生物学研究的发展,利用培养细胞系统工业化生产人类需要的植物产物,将能有效地保护自然资源,减少人工化学合成,促进生态环境的良性循环和社会的可持续发展。

思考题

1. 一个好的悬浮细胞系有哪些特征?用于建立悬浮细胞系的愈伤组织有何要求?
2. 建立悬浮细胞系的关键技术有哪些?
3. 悬浮细胞系在继代培养中的群体生长规律。
4. 细胞大规模培养有哪些培养系统?
5. 植物细胞规模培养与次生产物生产前景及需要研究解决的问题。

第六章

原生质体培养

第一节　原生质体研究概况

植物原生质体（protoplast）是指除去了细胞壁后的裸露的球形细胞。原生质体虽然没有了细胞壁，但仍能进行植物细胞的各种基本生命活动，如蛋白质和核酸的合成、光合作用、呼吸作用以及通过质膜的物质交换等，这极有利于探讨许多细胞生理问题。同时，由于原生质体在诱导条件下能发生融合，在离体培养条件下可能再生植株，因此，原生质体培养研究在理论上和实践上都具有重要意义。

在植物原生质体培养研究的发展历程中有几个值得提出的重要成就：

1880年，Hanstein首次使用原生质体（protoplast）一词，植物学上是指植物细胞通过质壁分离后可以和细胞壁分开的那部分细胞质。

1892年，Klercker用机械方法首次从藻类中分离得到原生质体，但由于这种方法产量低，不能从分生细胞和其它液泡化程度不高的细胞中分离原生质体，因而未能被广泛使用。

1960年，英国诺丁汉（Nottingham）大学植物学系的 Cocking首次采用纤维素酶从番茄幼苗根尖中分离原生质体获得成功，开创了用酶法大规模分离原生质体的新时期。

1971年，Takebe等首次得到烟草叶肉原生质体培养的再生植株。

1985年，Fujimura等获得第一例禾谷类作物——水稻原生质体培养再生植株。

1986年，Spangenberg等利用单个原生质体培养再生植株在甘蓝型油菜上获得成功。

据统计，自从 1971年 Takebe等首次报道从烟草叶肉原生质体再生植株以来，已从分属 49个科、160多个属的 360多种植物的原生质体培养中获得了再生植株（表 6.1）。特别是从 20世纪 80年代以来，有不少重要的农作物和经济作物，尤其是一直被认为难以培养成功的一些禾谷类作物的原生质体培养都相继取得了突破性进展。目前，获得原生质体植株的重要农作物和经济作物有水稻、小麦、玉米、马铃薯、大麦、高粱、谷子、甘蔗、棉花、大豆、油菜、花生、亚麻、甜菜、向日葵、蚕豆、豌豆和咖啡等；蔬菜作物有番茄、茄子、黄瓜、甜瓜、胡萝卜、芹菜、洋葱、甘蓝、花椰菜、芥菜、大白菜、红菜薹、菜心、豇豆、刀豆、芫荽、丝瓜、菜豆和魔芋等；果树和林木植物有柑橘、苹果、梨、葡萄、樱桃、草莓、柿、猕猴桃、番木瓜、枇杷、香蕉、龙眼、杨树、榆树、泡桐、桑树、悬铃木、欧洲云杉和白云杉等；药用植物有当归、地黄、川芎、防风、半夏、前胡和毛曼陀罗等；花卉植物有菊花、康乃馨和天竺葵等。还有一些真菌的原生质体培养也获得了再生植株。虽然现在原生质体培养仍以农作物和经济作物为主，但已开始从一年生向多年生，从草本向木本，从高等植物向低等植物发展。

表 6.1 植物原生质体培养再生植株成功的科及其种数

科	数量		科	数量	
	属	种或亚种		属	种或亚种
猕猴桃科 (Actinidiaceae)	1	3	亚麻科 (Linaceae)	1	8
夹竹桃科 (Apocynaceae)	1	1	木兰科 (Magnoliaceae)	1	1
天南星科 (Araceae)	1	1	锦葵科 (Malvaceae)	2	2
五加科 (Araliaceae)	2	2	桑科 (Moraceae)	2	2
萝藦科 (Asclepiadaceae)	3	3	芭蕉科 (Musaceae)	2	2
桔梗科 (Campanulaceae)	1	1	木犀科 (Oleaceae)	1	1
忍冬科 (Caprifoliaceae)	1	1	西番莲科 (Passifloraceae)	1	3
番木瓜科 (Cariceae)	1	1	松科 (Pinaceae)	6	9
石竹科 (Caryopyllaceae)	3	9	悬铃木科 (Platanaceae)	1	1
藜科 (Chenopodiaceae)	1	1	蓼科 (Polygonaceae)	1	1
菊科 (Compositae)	15	30	毛茛科 (Ranunculaceae)	2	3
旋花科 (Convolvulaceae)	1	2	木犀草科 (Resedaceae)	1	5
十字花科 (Cruciferae)	12	28	蔷薇科 (Rosaceae)	5	12
葫芦科 (Cucurbitaceae)	1	4	茜草科 (Rubiaceae)	1	1
大戟科 (Euhorbiaceae)	1	1	芸香科 (Rutaceae)	3	9
苦苣苔科 (Gesneriaceae)	1	1	杨柳科 (Salicaceae)	1	8
牻牛儿苗科 (Geraniaceae)	1	3	檀香科 (Santalaceae)	1	1
禾本科 (Gramineae)	19	35	无患子科 (Sapindaceae)	1	1
金丝桃科 (Hypericaceae)	1	2	玄参科 (Scrophulariaceae)	4	5
鸢尾科 (Iridaceae)	1	1	茄科 (Solanaceae)	11	81
唇形科 (Labiatae)	1	1	榆科 (Ulmaceae)	1	1
豆科 (Leguminosae)	23	55	伞形科 (Umbelliferae)	13	16
百合科 (Liliaceae)	6	8	荨麻科 (Urticaceae)	1	1

(引自许智宏,1997)

如前所述,原生质体是没有了细胞壁的植物细胞。因此,在原生质体的制备过程中,就有可能产生一些不完全的原生质体,常见的有关名词及含义如下。

① 亚原生质体 (subprotoplast) 在原生质体分离过程中,有时会引起细胞内含物的断裂而形成一些较小的原生质体,称作亚原生质体。它可以具有细胞核或没有细胞核。

② 微小原生质体 (miniprotoplast) 近年来利用细胞松弛素 B制备形成的、由原生质膜和薄层细胞质所包围的细胞核或部分染色体的小原生质体。仅含部分染色体的微小原生质体一般来源于细胞核正处于分裂过程中的细胞。

③ 原生质球 (spheroplast) 制备微生物原生质体时,如果有残存的细胞壁但仍是圆球形常

称之为原生质球。高等植物胚乳细胞原生质体研究中曾使用过这一名词。

原生质体由于除去了细胞壁这个细胞与外部环境之间的天然屏障，使得其成为一个理想的实验系统而被广泛地应用于体细胞遗传学、细胞生物学、生理学、病理学、病毒学、分子生物学和育种学等领域的研究中。但原生质体培养成功与否往往与原生质体的分离和培养有着直接的关系，而分离和培养的成功又涉及到许多因素，以下我们将就有关技术方法及其所涉及的因素加以讨论。

第二节　原生质体分离

植物原生质体是除去了细胞壁之后被质膜所包围的裸露细胞。获得大量而有活力的原生质体是原生质体培养能否成功的关键。和动物细胞不同，植物细胞外部有一层坚硬的细胞壁，细胞壁的主要成分为纤维素、半纤维素、果胶质和少量蛋白质等。在细胞分化过程中，不仅各种成分的比例发生变化，而且还逐渐增加木质素等次生物质。从植物中分离原生质体的研究最早是Klercker(1892)用机械方法从藻类中分离得到原生质体。由于这种方法只能从那些高度液泡化的细胞中分离得到有限的原生质体，现已很少使用。1960年 Cocking首次用酶法从番茄根尖中分离得到原生质体，从而开创了用酶法分离植物原生质体的新时期，同时也打开了利用原生质体作为实验材料的许多重要的研究领域。从理论上讲，只要用适当的酶处理，就能从任何植物的任何活的组织或培养的细胞系中分离得到原生质体。但对于原生质体培养来说，要得到产量高、活性强并能分裂再生成完整植株的原生质体，则受许多因素的影响。对于原生质体分离时的数量和质量来说，主要受供试材料，酶的种类、浓度及其组合，酶液的渗透压，酶解时间、温度和纯化方法等因素的影响。

一、材料的选择

一般来说，植物的各个器官，如根、茎、叶、花、果实、种子、子叶、下胚轴及其愈伤组织和悬浮细胞等都可以作为分离原生资体的材料。但是，要获得高质量的原生质体，要注意选择和扩大研究所需的合适的基因型，最终打破基因型的限制，使之具有普遍的实用意义。

原生质体起始材料的特性和生理状况是决定原生质体质量的重要因素之一，一般选用生长旺盛、生命力强的组织作为起始材料。另外，肥水条件、生长季节、植物年龄和光照等都明显地影响原生质体的产量和活力。

实践证明，叶肉细胞是分离原生质体较好的材料，从叶片中可以分离出大量的比较均匀一致的原生质体。由于叶肉细胞排列疏松，酶的作用很容易到达细胞壁，而且叶肉原生质体有明显的叶绿体存在，为选择杂种细胞提供了天然的标记。由叶片制备原生质体时，植株的年龄和生长条件十分重要，一般选用植株上充分展开的叶片。

由于从正常生长的植株上取材往往受各种环境条件和植株本身生理条件的影响，因而有许多研究者采用试管苗作为原生质体的来源。用试管苗分离原生质体时，在分离前不必作灭菌处理，而且试管苗完全可以在人为控制的条件下生长，一旦建立可用于分离和培养的最适条件，就可以提高实验的重复性。

用实生苗的子叶和下胚轴作为供体材料分离和培养原生质体,比用试管苗有较多的优越性。实生苗易于消毒,种子萌发的条件容易控制,可保证实验材料的一致性。同时,实生苗能提供大量发育同步的幼嫩细胞,具有较强的生活力和分化能力。但是,对一些植物来说,实生苗在遗传上杂合程度比较高,遗传分离较大,因此,在改良品种的个别性状方面不太适用。

用愈伤组织或悬浮细胞制备原生质体时,细胞系建立时间的长短,继代培养的时间和培养基的成分等都影响原生质体分离的数量和质量。一般选用结构疏松并处于对数生长期的细胞分离原生质体效果较好。另外,培养细胞常会发生变异,非整倍体发生频率较高,不像从叶肉细胞来源的原生质体那样在遗传上整齐一致。

对于茄科植物,一般选择生长旺盛,生理状态一致,刚刚展开的无菌苗的幼嫩叶片分离原生质体。对于十字花科植物,一般认为以种子萌发 4～5 d的无菌苗下胚轴作为供体材料,相对于其它组织如叶片、子叶和根尖等,得到的原生质体活力强,再生植株频率高。对于豆科植物,尤其是籽粒型食用豆科植物如大豆、蚕豆、花生和豇豆等,一般选用未成熟种子胚的子叶制备原生质体,其分离率高,培养效果好。对于禾本科植物,用叶肉细胞分离的原生质体培养相当困难,一般选用从幼胚、幼穗、花药(粉)或成熟胚建立的胚性愈伤组织及其胚性悬浮细胞系分离原生质体,效果较好。原生质体的产量和质量取决于培养细胞的生长速率和生长时期,连续继代(每隔 3～4 d继代 1次)的悬浮培养物和处于对数生长期的细胞最适宜于分离原生质体。

二、酶

植物细胞壁主要由纤维素(cellulose)、半纤维素(hemicellulose)和果胶质(pectin)等组成,纤维素和半纤维素主要组成细胞壁的初生结构和次生结构,而果胶质为连接细胞中胶层(mesoglea)的主要成分。分离植物原生质体的酶根据其作用大致可分为纤维素酶(cellulase)、半纤维素酶(hemicellulase)和果胶酶(pectase)等。纤维素酶和半纤维素酶主要分别降解组成细胞壁的纤维素和半纤维素,而果胶酶主要是降解中胶层。一般来讲,酶液中只要含有一定浓度的纤维素酶和果胶酶即可分离出原生质体,有些材料需要加入半纤维素酶、蜗牛酶等。一些常用的商品酶制剂见表 6.2。

最常用的纤维素酶是 Cellulase Onozuka R－10和 Cellulase Onozuka RS。最常用的果胶酶是 Pectinase, Macerozyme R－10和 Pectolyase Y－23,其中 Cellulase Onozuka RS和 Pectolyase Y－23分离原生质体的效率较高,但价格也很昂贵。崩溃酶(driselase)同时具有纤维素酶、果胶酶、地衣多糖酶(lichenase)和木聚糖酶(xylanase)等几种酶的活性,对于由培养细胞中分离原生质体特别有用。

粗制的商品酶制剂中通常含有核酸酶(nuclease)和蛋白酶(proteinase)等杂质,影响酶的活性和原生质体的活力。因此,在有些情况下,使用之前需要对酶进行纯化。常用的方法是将酶液在 4℃下通过 Bio－GelP_6 或 Sephadex G－25凝胶柱进行过滤纯化。

酶的活性与 pH有关。按照生产厂家的说明,Cellulase Onozuka R－10和 Macerozyme R－10的最适 pH分别为 5～6和 4～5,在分离原生质体时一般将酶液的 pH调节在 4.7～6.0之间。对于分离原生质体的酶,大多数酶活性的最适温度为 40～50℃,但这个温度对植物细胞来说显得太高。因此,一般在 25～30℃的温度下进行酶解,有利于保持原生质体的活力。

酶溶液需要低温贮藏,通常贮存于低温冰箱中,可保存数月而不丧失活性。

表 6.2　植物原生质体分离常用的一些商品酶

酶	来源	生产厂家
纤维素酶类		
Cellulase Onozuka R－10	Trichoderma viride	Kinki Yakult Manuf Co Ltd., Nishinomiya, Japan
Cellulase Onozuka RS	Trichoderma viride	Kinki Yakult Manuf Co Ltd., Nishinomiya, Japan
Meicelase P	Trichoderma viride	Meiji Seika Kaisha Ltd., Tokyo, Japan
Cellulysin	Trichoderma viride	Calbiochem, California 92073, USA
Driselase	Irpex lacteus	Kyowa Hakko Kogyo Co Japon
Cellulase	Aspergillus niger	Sigma Chemical Co., St Louis, MO 63178, USA
纤维素酶 EA－867	Trichoderma viride	中国科学院上海植物生理研究所
果胶酶类		
Pectolyase Y－23	Aspergillus japonicus	Kikkoman Shoyu Co., Japan
Macerozyme R－10	Rhizopus arrhizus	Kinki Yakult Manuf Co Ltd., Nishinomiya, Japan
Macerozyme		Yakult Biochemicals Co., Japan
Pectinase	Rhizopus oryzae	Sigma Chemical Co., St Louis, MO 63178, USA
PATE (Pectic－Acid－Acetyl－Transferase)		Hoechst, Germany
Pectinal		Rohm and Hass Co Inde Pendence Hall West Philadephia, Pennsylvania 19105, USA
半纤维素酶类		
Hemicellulase H－2125	Rhizopus ssp.	Sigma Chemical Co., St Louis, MO 63178, USA
Rhozyme HP－150	Aspergillus niger	Rohm and Haas Co Philadelphia, Pennsylvania 19105, USA

三、渗透压稳定剂

植物细胞壁对细胞有着良好的保护作用，除去细胞壁之后，如果酶液中的渗透压和细胞内的渗透压不平衡，则原生质体有可能失水皱缩或吸水涨破。因此，为了保持释放出的原生质体的活力和质膜的稳定性，必须使原生质体处于一个等渗的环境中。在酶液、原生质体洗液和培养基中的渗透压应基本上与原生质体的等渗或比细胞内的渗透压略高些。原生质体在轻微高渗溶液中比在等渗溶液中更为稳定，较高水平的渗透压可以阻止原生质体的破裂和出芽，但也有可能抑制原生质体的分裂。

在原生质体分离和培养中，广泛使用的渗透压调节剂有甘露醇（mannitol）、山梨醇（sorbitol）、蔗糖（sucrose）、葡萄糖（glucose）、果糖（fructose）、麦芽糖（amylomaltose）、半乳糖（galactose）和木糖醇（xylitol）等。使用浓度根据植物材料而异，一般在 0.2～0.8 mol/L 之间。对同一种植物而言，子叶和下胚轴游离原生质体时需要较高的渗透压，愈伤组织次之，胚性悬浮细胞较低。另外，在溶液中加入某些盐类如 $CaCl_2$、KH_2PO_4、MES（2－氮吗啉乙烷磺酸）和葡聚糖硫酸钾等可

以提高质膜的稳定性,增加完整原生质体的数量和活力。其中,MES作为 pH缓冲调节剂对保持酶解物的酸碱环境起缓冲作用,葡聚糖硫酸钾是通过降低酶液中核糖核酸酶(ribonuclease)活性,从而有利于保持原生质体质膜的稳定性。此外,加入牛血清蛋白可防止细胞壁降解过程中对细胞膜和细胞器的破坏。加入少量 $AgNO_3$、过氧化物歧化酶会减轻酶解时产生的乙烯、O_2^- 自由基对细胞膜的损伤,从而提高原生质体的活力。

四、原生质体的游离

1. 材料的预处理

从生长在非无菌条件下的植株上取来的材料,首先必须进行表面消毒。在游离原生质体前对供体材料进行预处理及预培养,可以提高某些材料原生质体的活力和分裂频率。子叶、下胚轴一般来自种子萌发数天后的无菌实生苗;叶片一般来自田间生长植株的幼嫩叶片或在新鲜培养基上继代培养一定时期的试管苗;愈伤组织或胚性悬浮细胞系用更换新鲜培养基若干天后的培养物,时间过长或过短都得不到高质量的原生质体。另外,用黑暗处理、低温处理和不同光质照射等方法,也可提高某些材料原生质体的产量和活力。例如龙胆试管苗的叶片只需用 4℃低温处理;甘蔗植株必须先在黑暗条件下培养 12 h,其后分离的原生质体才能分裂。

2. 酶解处理

酶解前,叶片和子叶要撕去下表皮,将去表皮的一面向下放入酶液中。如果去表皮很困难,则可把叶片切成小块后放入酶液中。下胚轴可直接切成小块后放入酶液中。对于愈伤组织或悬浮细胞,如果细胞团的大小很不均一,可先用筛网过滤以除去大的细胞团,留下较均匀的小细胞团进行酶解。叶片和下胚轴等组织切成小块放入酶液中后,可真空抽滤 5～10 min,待组织中无气泡逸出为止,使酶液能充分渗入组织中,提高酶解效率。检查酶溶液是否已充分渗入的标准是当真空处理结束后大气压恢复正常时组织小块是否下沉,若下沉则表示酶液已充分渗入组织,反之则需继续进行渗透处理。

酶解处理所遵循的原则是利用尽可能低的酶浓度和尽可能短的酶解时间获得大量而有活力的原生质体。植物材料应按比例和酶液混合,才能有效地游离原生质体。一般叶片、子叶和下胚轴需酶量较少,而愈伤组织和悬浮细胞需酶量较大,每克材料一般用酶量 10～20 mL。由于不同材料的生理特性不同,对酶液中渗透压的要求也不同。在研究分离条件时,必须试验在不同渗透压下的不同浓度的细胞反应,找出最适的渗透压剂的种类和浓度。酶的种类、浓度和酶解时间也因材料而异。一般来讲,对于子叶、下胚轴和叶片等材料,常选用 Cellulase Onozuka R－10、Macerozyme R－10等活性中等的酶,并且用低浓度的酶液进行较短时间的酶解处理,一般几 h即可。对于愈伤组织和悬浮细胞等难游离的材料,常用 Cellulase Onozuka RS、Pectolyase Y－23和 Rhozyme HP－150等活性较强的酶,而且采用较高浓度的酶液酶解处理几 h到十几 h。酶液的 pH一般调节至 5.4～6.0之间。

酶解处理一般在 24～28℃、黑暗、静止条件下进行,光照可引起细胞膜损伤,造成原生质体的活力下降。在处理过程中,酶解物每隔一段时间用手轻轻摇动几下或置于低速摇床上(30～50 r/min)轻轻振荡,以促进原生质体的释放。

五、原生质体的纯化

植物材料经酶解处理后的混合物中除了完整无损伤的原生质体之外，还含有未去壁的细胞、细胞碎片、叶绿体、微管成分和细胞团等组织残渣，只有将这些杂质和酶液除掉，使原生质体纯化，才能进行培养。一般先将酶解混合物通过一定孔径的筛网（40～100 μm）过滤，除去未消化的细胞团和组织块等较大的杂质，收集滤液于离心管中。因植物材料和所使用的渗透压稳定剂不同，进一步的纯化常用的有以下几种方法。

1. 沉降法

在酶解处理中用相对分子质量较小的甘露醇作为渗透压调节剂时，将收集的滤液低速离心，使原生质体沉降于管底。转速的控制以将原生质体沉淀而细胞碎片等杂质仍悬浮在上清液中为准，一般于 500～800 r/m的转速下离心 3～5 min，用吸管小心地吸取上清液，再用洗涤液重新悬浮原生质体，再次离心，除去上清液，如此重复 3次。最后用原生质体培养基洗涤 1次，然后用培养基将原生质体调整到一定密度后进行培养。这种方法的优点是纯化收集方便，操作简单，原生质体丢失少。但这种方法在漂洗过程中易造成原生质体的损伤，并且纯度不够好，常存在少量脱壁不完全的细胞和破碎的原生质体。

2. 漂浮法

在酶解处理中用相对分子质量较大的蔗糖作为渗透压调节剂时，将收集的滤液于 1 000 r/m的转速下离心 10 min，原生质体将漂浮于溶液的表面，细胞碎片等杂质将下沉到管底。用巴斯德（Pasteur）吸管小心地将原生质体吸出，转入到另一离心管中，这样反复离心和重新悬浮 3次，用原生质体培养基洗涤 1次后调整到所需密度进行培养。这种方法的优点是可以收集到较为纯净的原生质体，并且可以避免在离心纯化过程中因振荡撞击或挤压引起的原生质体破裂或损伤，所用试剂简单，成本低廉。但用这种方法纯化，原生质体在数量上损失较多，从而造成原生质体的获得率较低。

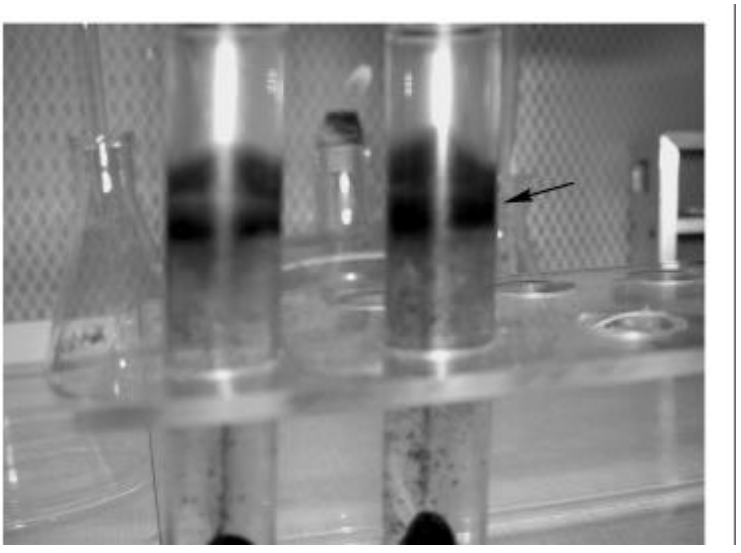


图 6.1　梯度离心纯化马铃薯叶肉原生质体

3. 梯度离心法

利用比重不同的溶液，经离心后使完整无损的原生质体处在两液相的界面之间，而细胞碎片等杂质则沉于管底，用这种方法可获得更为纯净的原生质体。如由顶部 6%聚蔗糖（Ficoll）和底部 9%聚蔗糖（溶于含有 7%山梨醇的 MS培养基中）组成的梯度经 150 g离心 5 min，细胞碎片将沉于管底，而原生质体则漂浮于上部（图 6.1）。

六、原生质体活力的测定

在原生质体培养前，常常先检测原生质体的活性。对于新分离出来的原生质体有以下几种测定方法，其中目前最常用的方法是荧光素双醋酸酯染色法。

1. 荧光素双醋酸酯（fluorescein diacetate，FDA）染色法

FDA本身无荧光,无极性,能自由地穿越完整的细胞质膜。FDA一旦进入原生质体后,受到原生质体内酯酶的作用,分解形成有荧光的极性物质——荧光素。荧光素不能自由地穿越细胞质膜,因而积累在有活力的原生质体中,当用紫外光照射时,便产生绿色荧光。而无活力的原生质体不能分解FDA,因此无荧光产生。FDA本身对植物细胞是活性染料,它既适合于研究单个原生质体,也适合于研究原生质体群体。

用FDA染色法测定原生质体活力的具体方法是:取纯化后的原生质体悬浮液0.5ml,置于10ml离心管中,加入FDA贮存液(2mg/L FDA的丙酮溶液,0℃贮存),使其最终浓度为0.01%,混匀于室温放置5min后,用荧光显微镜观察。激发光滤光片可用QB-24(可透过300~500 nm的光),压制滤光片可用JB-8(可透过500~600 nm的光)。发绿色荧光的原生质体为有活力的,不产生绿色荧光的为无活力的。由于叶绿素的关系,叶片、子叶和下胚轴的原生质体发黄绿色荧光的为有活力的,发红色荧光的为无活力的。以有活力的原生质体数占观察原生质体总数的百分数表示原生质体活力。

原生质体活力 = (有活力的原生质体数/观察原生质体的总数)×100%

2. 酚藏花红(phenosafranine)染色法

在原生质体悬浮液中加入酚藏花红溶液,使其终浓度为0.01%,无活力的原生质体将被染成红色,而有活力的原生质体则不能被染色。

3. 荧光增白剂(calcofluor white, CFW)染色法

CFW染色可通过检测细胞壁的形成而确定原生质体的活力。CFW可结合于新合成细胞壁的β-糖苷上,在400 nm激发光照射下可产生绿色荧光。新制备的原生质体,如果细胞壁分解完全,则原生质体周围看不到绿色的荧光,若为叶肉原生质体,则呈现由叶绿素产生的红色荧光。在培养过程中,有活力的原生质体随着细胞壁的再生产生绿色荧光。

用CFW染色法测定原生质体活力的具体方法是:吸取新制备的原生质体悬浮液或培养一定时间的原生质体0.1~0.2ml,置于小离心管中,加入等体积0.1% CFW溶液(用与原生质体等渗的甘露醇配制)混匀。室温静置5~10min,于500 r/m下离心3min,再用与原生质体等渗的甘露醇溶液离心洗涤3次,然后加入0.1~0.2ml培养液,吸取1滴悬浮液于载玻片上,用荧光显微镜进行观察(波长360~440 nm)。

4. 伊凡蓝(Evans blue)染色法

用0.025%的伊凡蓝溶液对原生质体进行染色,只有已受损伤的细胞才能摄取这种染料,而完整无损的活细胞则不能摄取这种染料。因此,凡不能染色的原生质体都为有活力的。

另外,还可以通过观察胞质环流作为有旺盛代谢的指标、用渗透压的改变测定原生质体大小的变化、用氧电极测定氧呼吸以表明其呼吸代谢和测定原生质体的光合活性以确定其生活力等方法来测定原生质体的活力。但是,真正确定原生质体的活力是看原生质体能否进行持续有丝分裂并再生植株。

第三节 原生质体培养

获得有活力的原生质体后,应用合适的培养方法,在适当的培养条件下,即可培养原生质体

再生出新的细胞壁，进而细胞进行持续分裂形成细胞团，进一步生长形成愈伤组织或胚状体，最终分化或发育形成完整植株。经过多年来大量的试验分析，影响原生质体离体培养再生植株的因素，除前面所述的植物基因型和原生质体来源外，主要有培养基、培养方法和培养条件等。下面将根据技术环节分别予以论述。

一、培养基

原生质体与植物细胞的主要差别是除去了细胞壁，原生质体培养所需的营养要求与培养植物组织和细胞的基本类同，原生质体培养基基本上是模仿植物组织和细胞培养的培养基修改而成的。纵观现有的原生质体培养基，都各有其特点，还没有普遍适用于所有植物的培养基。目前，茄科植物的原生质体培养大多以 MS (Murashige和 Skoog, 1962)、NT (Nagata和 Takebe, 1971)和 K3 (Saka等，1987)为基本培养基，十字花科和豆科植物多数以 B5 (Gamborg等，1968)、KM8p (Kao和 Michayluk, 1975)、K8p (Kao, 1977)和 KM (Kao和 Michayluk, 1975)为基本培养基，禾谷类植物多数以 MS (Murashige and Skoog, 1962)、Du (Power等，1976)、N6 (朱自清等，1975)、KM和 AA (Muller等，1978)为基本培养基。但原生质体无论在结构上和代谢上与细胞比较有很大差异，在培养原生质体时，单纯地模仿细胞培养基往往不能达到满意的培养效果，需要考虑到原生质体的特殊要求。

1. 无机盐

无机盐是组成培养基的主要成分，根据其含量可分为大量元素和微量元素。在原生质体培养的研究中，对微量元素的作用和影响很少涉及。一般认为原生质体培养基中的大量元素应比愈伤组织培养基中的浓度低。在大量元素中，对原生质体培养效果影响最大的是 Ca^{2+}的浓度和氮源的种类及其浓度。由于 Ca^{2+}能保持原生质体质膜的稳定性，因此，较高浓度的 Ca^{2+}对原生质体的分裂是有利的。Von Arnold等 (1977)证实高浓度的 Ca^{2+}能促进豌豆原生质体的存活和细胞分裂。因此，在许多植物原生质体培养基中应用大量元素减半的 MS培养基时，Ca^{2+}的浓度不降低，而是与 MS培养基中所用的浓度相同。

培养基中氮源的种类和浓度对原生质体的培养效果也很重要。在小麦原生质体的培养中，起始培养基中的氨态氮较低，在添加新鲜培养基时适当增加氨态氮，可以促进细胞分裂和提高植板率。在水稻原生质体培养基中，采用加氨基酸的 AA培养基代替无机氮，证明能促进原生质体再生细胞的分裂和提高植板率。

2. 渗透压稳定剂

原生质体培养时，必须使其处于一个等渗或稍低于细胞内渗透压的外界环境。因此，在原生质体培养基中，需有一定浓度的渗透压稳定剂来保持原生质体的稳定。渗透压调节剂的种类对原生质体分裂频率的影响也较大。常用的渗透压调节剂有甘露醇、蔗糖、山梨醇、葡萄糖、木糖醇及麦芽糖等。这些物质既能保持培养基的渗透浓度，又是原生质体再生细胞生长发育的碳源，其种类和浓度对原生质体的培养效果影响较大。在不同植物中有不同的、甚至是相互矛盾的报道。但近年来的发展趋势是用蔗糖代替甘露醇和山梨醇，葡萄糖代替蔗糖或大部分葡萄糖加有少量蔗糖，麦芽糖代替蔗糖或葡萄糖。在原生质体培养基中随着细胞壁的再生和细胞的持续分裂，应不断降低渗透压，才会促进细胞团的进一步生长和愈伤组织的形成。培养开始后 7～10 d，大部分有活力的原生质体已经再生出细胞壁并进行了几次分裂，此后通过定期添加新鲜培养基的方

法,每 1～2周使渗透剂的浓度降低 0.05～0.1 mol/L,往往能促进培养物持续生长,发育成愈伤组织并再生植株。周宇波等 2001在马铃薯叶肉原生质体培养中发现,在原生质体培养初期,培养基中糖醇的种类和配比对细胞分裂与发育具有显著影响。在相同糖醇浓度下,只使用甘露醇和蔗糖,细胞虽能启动分裂但不能继续发育,同时,出芽细胞和异常膨大细胞比例显著增加。而培养基中含有山梨醇、木糖醇、纤维二糖和葡萄糖等多种糖醇时,则有利于细胞壁形成和细胞持续分裂生长,特别是纤维二糖对细胞壁的再生具有良好的促进作用 图 6.2)。

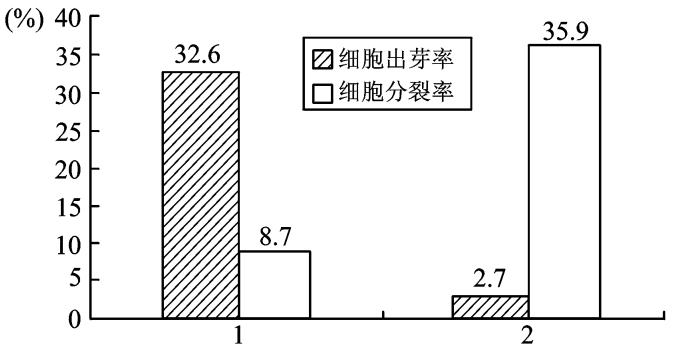


图 6.2 培养基糖醇变化对马铃薯原生质体细胞分裂和出芽率的影响
1. 在只含甘露醇、蔗糖和肌醇的培养基中培养 7 d;
2. 在含蔗糖、纤维二糖、葡萄糖、甘露醇、肌醇、木糖醇和山梨醇的培养基中培养 7 d
(引自周宇波等,2001)

3. 有机成分

原生质体的生长发育需要维生素类及各种有机成分。一般来讲,含有丰富的有机物质的培养基有利于细胞分裂。如 Kao等 (1975)在培养豌豆属的一个种 Vicia hajastana的原生质体时,为了适应低密度的培养,设计了 KM8p培养基,其中含有丰富的有机成分,包括维生素、氨基酸、有机酸、糖及糖醇和椰子汁等。这个培养基后来在原生质体培养中得到了广泛应用,并在许多研究中取得了好的效果。在培养基中添加谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸、丝氨酸、丙酮酸、苹果酸、柠檬酸、延胡索酸、腺嘌呤、水解乳蛋白、水解酪蛋白、椰乳、酵母提取物、脱落酸、尸胺、腐胺、尿胺、精胺、亚精胺、对甲氧基苯甲酸、小牛血清和蜂王浆等有机添加物,对于促进原生质体的分裂和细胞团及胚状体的形成都有一定的作用。但对具体的植物种类却不能一概而论,都要经过严格的实验加以确定。

4. 激素

激素对原生质体细胞壁生成、细胞分裂启动、愈伤组织形成和植株再生都非常重要。不同植物种的原生质体培养,对激素的种类和浓度的要求存在较大的差异。甚至同种植物不同细胞系来源的原生质体培养,对激素的要求也不尽相同。原生质体培养的不同阶段,由于生长发育的需求不同,对激素也有不同的选择。但总的来说,生长素和细胞分裂素是必要的,并需要二者的适当配比。同时,在原生质体的不同发育阶段,如起始分裂、细胞团形成、愈伤组织形成、器官或胚状体发生和植株再生等,需要不断地对激素的种类和浓度进行适时调整。另外,在每一步调整激素时,还应考虑到激素的后效应。一般认为,在培养基中加入生长素 2,4－D对原生质体的分裂仍然是必需的。自开始培养到形成愈伤组织,大多数使用 2,4－D,也有用 2,4－D与 NAA、BA或 ZT等相结合的。而将愈伤组织转入到分化培养基时,需降低或除去 2,4－D,同时降低 NAA浓度或用 IAA代替,适量增加 BA、KT或 ZT。

5. pH

原生质体培养基的 pH一般为 5.5～5.9,pH过高或过低都会对原生质体的活力及其分裂产生不利的影响。

MS、B5和 N6等培养基的配方已在第三章中介绍,下面列出应用较为普遍的 NT、KM及 KM8p的培养基组成成分,供在实际使用中参考 (表 6.3)。

表 6.3　植物原生质体培养常用培养基配方 (mg/L)

	KM (Kao & Michayluk, 1975)	KM8p (Kao & Michayluk, 1975)	NT (Nagata & Takebe, 1971)
无机成分			
NH_4NO_3	600	—	—
KNO_3	1 900	1 900	950
NH_4NO_3	—	600	825
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	300	300	1 233
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	600	600	220
KCl	300	300	—
KH_2PO_4	170	170	680
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	28	—	27.8
NaFe−EDTA	—	28	—
Na_2 −EDTA	—	—	37.3
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10.0	10.00	—
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	—	—	22.3
H_3BO_3	3.0	3.00	6.2
$ZnSO_4 \cdot H_2O$	—	—	—
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0	2.00	8.6
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	0.25	0.25
$CuSO_4 \cdot 7H_2O$	—	—	0.03
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	0.025	0.025
KI	0.75	0.75	0.83
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	0.025	0.025
有机成分			
肌醇	100	100	100
烟酸胺	1.0	1	—
维生素 A	0.01	0.005	—
维生素 B_1	1.0	10	1
维生素 B_2	0.2	0.1	—
维生素 B_6	1.0	1	—
维生素 B_{12}	0.02	0.01	—
维生素 C	2.0	1	—
泛酸钙	1.0	0.5	—
维生素 D_3	0.01	0.005	—
叶酸	0.4	0.2	—
生物素	0.01	0.005	—
氨基苯甲酸	0.02	0.01	—
柠檬酸	—	10	—
苹果酸	—	10	—
延胡索酸	—	10	—
丙酮酸钠	—	5	—

续表

	KM (Kao & Michayluk, 1975)	KM8p (Kao & Michayluk, 1975)	NT (Nagata & Takebe, 1971)
氯化胆碱	1.0	0.5	—
ZT	0.5	0.1	—
2,4－D	0.2	1	—
NAA	1.0	—	3
BA	—	—	1
葡萄糖	68 400	68 400	—
蔗糖	250	125	1 000
果糖	—	125	—
核糖	—	125	—
木糖	—	125	—
甘露糖	—	125	—
鼠李糖	—	125	—
纤维二糖	—	125	—
山梨醇	—	125	—
甘露醇	—	125	0.7*
水解酪蛋白	—	125	—
椰子乳	—	10	—

＊单位是 mol/L。

二、原生质体培养方法

原生质体的培养方法大体上可分为液体培养、固体培养和固液结合培养等几种类型，并由此还派生出其它一些方法。培养方法对于原生质体的生长和分裂非常重要，不同植物的原生质体可能适应于不同的培养方法。一般认为，对于容易分裂的植物的原生质体，采用液体浅层和液体浅层－固体双层培养系统即可获得较好的结果。对于难以分裂的植物的原生质体，采用琼脂糖包埋、液体浅层－固体双层和看护培养系统效果较好。对于过去认为难以培养成功的禾谷类作物，由于改进了培养基组分和培养技术，特别是采用了琼脂糖包埋和看护培养方法，取得了很好的效果。

1. 液体浅层培养法

将原生质体以一定密度悬浮在培养液中，用巴斯德吸管将原生质体悬浮液转移到培养皿或三角瓶中，使成一薄层。一般在直径 3 cm的培养皿中加 1～1.5 ml培养液，6 cm培养皿中加 2～3 ml培养液。用 Parafilm膜密封后，置于人工气候箱中，静止培养。该方法的优点是操作简便，对原生质体的伤害较小，通气性好，代谢物易扩散，并且易于补充新鲜培养基，形成细胞团或小愈伤组织后也易于转移，是目前原生质体培养中广泛采用的方法之一。其缺点是原生质体在培养基中分布不均匀，常常发生原生质体之间的黏连现象，或造成局部原生质体的密度过高，从而影响了原生质体再生细胞的进一步生长发育，并且难以定点观察和跟踪单个原生质体的生长发育过程。

2. 悬滴培养法

将悬浮有原生质体的培养液用滴管在无菌干燥的培养皿盖中均匀地滴上数滴，每滴的量约在 50～100 μl，其数目以滴与滴之间不相接触为原则。在皿底内加入少量培养液以保持湿度，将皿盖翻转过来盖于皿底上，用 Parafilm膜封口后进行培养。该方法的优点是所需材料少，生长快，容易添加新鲜培养基，不易污染，并且由于微滴的体积小，在一个培养皿中可以做很多种培养基的对照实验，有利于原生质体的低密度培养。其缺点是原生质体分布不均匀，容易集中在小滴中央。另外由于液滴与空气的接触面大，培养液容易蒸发而造成培养基成分浓度变高。可用在液滴上覆盖矿物油的办法解决蒸发问题。

3. 微滴培养法

将 0.1ml左右的原生质体悬浮液用滴管滴于培养皿底部，在 6 cm培养皿中可滴 5～7滴，密封后进行培养。该方法的优点是可用倒置显微镜观察原生质体的发育过程，易于添加新鲜培养基，可用于较多组合的实验或进行融合体及单个原生质体的培养。其缺点与悬滴培养法相似，原生质体易于聚集在小滴的中央，微滴容易挥发。

4. 固体平板法

将悬浮在液体培养基中的原生质体悬浮液与热融并冷却至 45°C的含琼脂或琼脂糖的培养基等量混合，使琼脂的最终浓度为 0.6%左右，迅速轻轻摇动，使原生质体均匀地分布于培养基中。然后将其转移到培养皿中，直径 6 cm的培养皿中可加入 5ml左右的混合物，冷却后原生质体将包埋在琼脂培养基中，封口后进行培养。该方法的优点是原生质体被彼此分开并固定了位置，可以避免细胞间有害代谢产物的影响，并便于定点观察，有利于跟踪观察单个原生质体发育过程，易于统计原生质体的分裂频率和植板率。其缺点是对操作要求较严格，在原生质体悬浮液与琼脂或琼脂糖培养基混合时温度必须合适，太高时会影响原生质体活力，太低时培养基凝固较快使原生质体分布不均匀，并且原生质体的生长发育比液体浅层法要慢。该方法在目前的常规培养中较少采用。

由于琼脂熔点较高，在固体包埋培养中只有保持琼脂培养基较高的温度和相对剧烈的摇动，才能使原生质体在培养基中分布均匀，这样容易对原生质体造成伤害。为此，人们不断寻找可在常温下凝固的物质来代替琼脂。近年来很多实验证明，琼脂糖是一种良好的培养基凝固剂，它不仅具有熔点低的特点，而且具有促进原生质体再生细胞分裂的作用。Shillito等 (1983) 对琼脂糖、琼脂及经过漂洗的纯净琼脂作了比较实验，发现尽管纯净的琼脂可以提高一些原生质体的植板率，但最好的结果是在琼脂糖上取得的，并且琼脂糖适用于广泛的植物种类。Thompson等 (1986) 在水稻原生质体的实验中证实，将琼脂糖的浓度从 0.6%提高到 1.2%，可以有效地减少原生质体膨胀所引起的出芽现象，从而提高培养初期原生质体的成活率和分裂频率。琼脂糖作为一种优良的凝固剂，在原生质体培养中的应用已越来越广泛。

5. 液体浅层 —固体平板双层培养法

在培养皿的底部先铺一薄层含琼脂或琼脂糖的固体培养基，再将原生质体悬浮培养液加于固体培养基的表面进行液体浅层培养。该方法的优点是固体培养基中的营养成分可以缓慢地释放到液体培养基中，以补充培养物对营养的消耗。同时，培养物产生的一些有害物质，也可被固体培养基吸收，从而更有利于培养物的生长。另外，在下层固体培养基中如果添加一定量的活性炭，可有效地吸附培养物所产生的有害物质，促进原生质体的分裂及细胞团的形成。

6. 琼脂糖珠培养法

该方法是由 Shillito等于 1983年建立的,具体做法是:将含有原生质体的琼脂糖培养基切成块后放到大体积的液体培养基中,置于旋转摇床上进行震荡培养,以利于通气。使用大体积的液体培养基是为了防止琼脂糖块过度破碎。另外,可以通过调整液体培养基的渗透压来调节培养物的渗透压,以利于原生质体的进一步生长和发育。这种方法由于改变了培养物的通气和营养环境,从而可以促进原生质体的分裂及细胞团的形成。实验证明,用这种方法可以促进番茄、芜菁和矮牵牛等的原生质体再生细胞的持续分裂,提高原生质体的植板率。Thompson等 (1986)在水稻原生质体培养中使用了琼脂糖珠培养法,将含有原生质体的液态琼脂糖培养基以大约 50 μl一滴滴于直径为 6 cm的培养皿中,待其凝固后,向其中加入 3 ml液体培养基。这样,琼脂糖培养基就处于液体培养基的包围之中,然后置于摇床上进行旋转培养,结果使原生质体的植板率得到了明显提高。

7. 饲养层培养法

饲养层培养法又称看护培养法或滋养培养法。该方法采用的是与花粉和细胞培养中看护培养法相似的原理,利用饲养层的原生质体刺激培养层的原生质体启动分裂,提高原生质体的植板率,比较适合于原生质体的低密度培养和某些难以培养的植物的原生质体培养。

饲养层培养法又可分为分层培养和混合培养两种。分层培养是先制备固体的饲养细胞层,再在其上植板培养层。饲养细胞层的制备方法是先用 X射线照射部分分离的原生质体,其剂量以能抑制细胞分裂但不破坏细胞的代谢活性为标准。照射后将原生质体清洗 2～3次,包埋于琼脂培养基中,然后铺于培养皿的底层构成饲养细胞层。将拟培养的有活力的原生质体植板于饲养细胞层的上面进行培养。植板可采用液体法或半固体法。混合培养是将经过 X射线照射而失去分裂能力的原生质体与有正常活力的原生质体相混合,一起包埋于琼脂培养基中进行固体平板法培养。

由于不同物种的原生质体之间也可以发生互馈现象,因此,饲养层细胞并不一定需要来自同种植物,往往用不同植物的细胞制备饲养层对原生质体培养更加有利。但也有研究表明,对于烟草和柑橘的原生质体来说,以本物种原生质体制备的饲养层比用其它物种细胞制备的饲养层更为有效。

在原生质体培养的研究工作中,可以根据材料特性和研究目的,选择适宜的培养方法,以提高原生质体的培养效率,使原生质体的整个培养过程达到系统化和程序化。

8. 原生质体培养体系的优化

原生质体的培养方式往往因植物不同和培养阶段不同而需要调整,以达到最佳的培养效果,这就涉及到整个原生质体培养体系的优化。由于培养方式的选择是与培养阶段相联系的,因此需要找到原生质体生长发育不同阶段的比较直观的形态学指标,同时筛选适于特定阶段的培养方式,科学地建立原生质体培养技术体系,达到操作规范、成功率高和重复性好的目的。

周宇波等 (2001)在马铃薯叶肉原生质体培养中比较了液体浅层静止培养、琼脂糖包埋培养、固－液双层培养及先液体培养再固－液双层培养对原生质体前期培养的效果。结果显示,以起始为液体浅层静止培养,然后固－液双层培养的培养方式,更有利于原生质体培养中细胞团和愈伤组织的形成。在这一培养系统中,原生质体培养分为 5个培养期,即液体浅层培养期,双层培养期,愈伤组织增殖期,过渡期和分化期。每一时期均有较明显的观察指标,从而增强了培养体系的重复性和可操作性。

① 液体浅层培养期　此阶段为 8～10 d。原生质体培养初期,细胞对培养环境十分敏感,这一时期进行液体浅层培养,可根据原生质体的生长情况随时调整细胞状态,促进细胞壁的再生和细胞脱分化。第一次添加新鲜培养基的时间和转入双层培养的时间是培养技术的关键所在。试验结果表明,细胞第一次分裂后(图 6.3a)的 1～3 d添加新鲜培养基,有利于细胞持续分裂和形成状态良好的小细胞团(图 6.3b)。

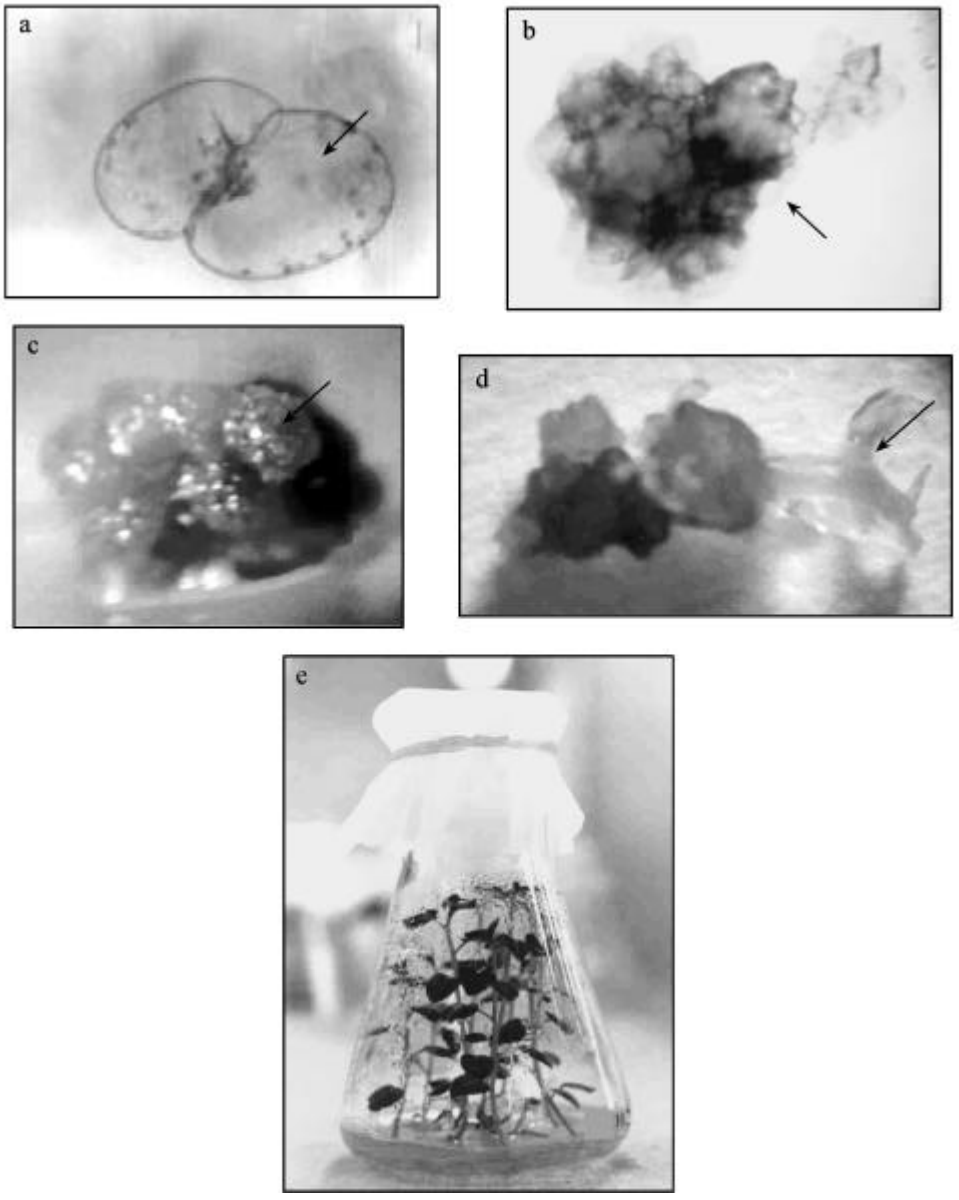


图 6.3　马铃薯叶肉原生质体培养的不同阶段
a 第一次细胞分裂;b. 细胞持续分裂形成细胞团;
c 胚性愈伤组织;d 芽分化;e 再生植株

② 双层培养期　在细胞分裂 2～4次时开始。转双层培养一方面可去除褐化坏死细胞对分裂细胞生长的干扰,另一方面也适合细胞和细胞团贴附的特性。试验证明,转双层培养的适宜时间是在细胞壁再生完整,细胞分裂 2～4次时。若推迟转移,许多状态良好的细胞团因贴附于培养皿底部而不易操作,反而使培养效率降低;若过早转移,则会造成大量分裂细胞停止生长。

③ 愈伤组织增殖期　当细胞持续分裂至肉眼可见的小愈伤组织时,将其转入与双层培养中固相培养基相同的新鲜培养基上,可以保证愈伤组织增殖的营养条件,促进愈伤组织增殖。

④ 愈伤组织过渡期　当愈伤组织增殖到直径 5mm左右时,将其转入到增加了氨离子浓度

约为分化培养基的 1/2,在此之前的培养基中没有)的过渡培养基上进行过渡培养,并使糖醇浓度始终保持在 0.35 mol/L,避免了培养过程中降低渗透压操作上的烦琐性和误差。愈伤组织的过渡培养有利于调整愈伤组织的状态,促进芽的分化。过渡培养期间,愈伤组织由无序生长到形成乳突状结构(图 6.3d),是愈伤组织进入分化状态的转折时期,其形态变化明显,因而也便于及时观察并调整培养措施。

⑤ 愈伤组织分化期 当愈伤组织在过渡培养基上培养 3~4周后,组织开始绿化,此时是转入芽分化培养的适宜时期,通过芽和根的分化培养,即可获得再生植株(图 6.3d, e)。

三、植板密度

原生质体的初始植板密度对原生质体的培养效率有显著的影响。在适宜的密度范围内原生质体易于分裂增殖。当原生质体密度过高时,往往会由于养分不足或细胞代谢物过多而妨碍再生细胞的正常生长。如果密度过低,原生质体的再生细胞一般不能持续分裂,可能是因为原生质体本身具有某种与分裂有关的物质,低密度时培养基中这种物质达不到一定的浓度,从而影响了原生质体的分裂增殖。因此,原生质体培养的密度一般是 1×10^4/ml至 1×10^5/ml。然而采用饲养层培养法培养时,则可大大降低原生质体密度,一般为每毫升 10~100个原生质体。应用悬滴培养法和微滴培养法还可进行单个原生质体的培养。

四、培养条件

原生质体的培养条件主要指培养的光照和温度条件。原生质体培养对培养条件的要求十分严格,且根据原生质体来源的不同,在不同的培养阶段有不同的要求。正确掌握培养条件,是保证原生质体进行细胞壁再生及细胞分裂和分化的重要前提。

1. 光照

新分离出来的原生质体应在散射光或黑暗中培养。一般而言,对于叶肉、子叶和下胚轴等带有叶绿体的原生质体,在培养初期最好置于弱光或散射光下,由愈伤组织和悬浮细胞制备的原生质体可置于黑暗中培养。在诱导分化阶段,要将培养物置于光下进行培养,其光强一般为 1 000~3 000 lx,光照时数为每天 10~16 h。

另外,光质也影响某些植物原生质体的培养效果。梁玉玲等(1997)以绿豆幼苗下胚轴原生质体为材料,研究了红、白和蓝光在细胞再生和细胞分裂中的作用。结果表明,各种光质条件下培养 6 h细胞壁均开始再生。但照射 8 h和 12 h后,原生质体细胞壁的再生率均表现为红光最高,白光次之,蓝光最小。与暗培养相比,8 h红光和白光对细胞壁的再生表现出促进作用,而蓝光的作用则不明显。他们的试验数据还表明,光照 12 h与 8 h相比,各种光质处理的细胞壁再生率均降低,但降低幅度以红光最小,白光次之,蓝光最大。这些结果说明红光和白光具有促进细胞壁再生的功能。这一现象同样表现在绿豆下胚轴细胞的第一次分裂过程中,红光和白光对细胞的第一次分裂有明显的促进作用,而蓝光的促进作用较小或不明显。

2. 温度

原生质体的培养温度一般为 25~30 ℃。不同的植物原生质体对温度的要求也不尽相同,如烟草原生质体适宜的培养温度为 26~28 ℃,棉花为 28~30 ℃,马铃薯为 23~25 ℃,豌豆和蚕豆的叶肉原生质体为 19~21 ℃,油菜的培养温度开始一周为 30~32 ℃,然后转入 26~28 ℃下的

培养效果较好。据认为,较高的培养温度不仅能影响一些物种原生质体分裂的速率,而且在迄今不能分裂的原生质体中,还可能是启动和维持分裂的一个前提。在分化阶段,培养温度一般控制在 25～26℃左右。

五、原生质体的发育和植株再生

原生质体在合适的培养条件下,先再生形成新的细胞壁,然后再生细胞进行分裂形成细胞团和愈伤组织,最后通过愈伤组织或胚状体途径获得再生植株。

1. 细胞壁再生

原生质体培养数小时后开始再生新的细胞壁,一至数天内便可形成完整的细胞壁。这时原生质体在表型上表现为体积增大,进而由原来的球形逐渐变成椭圆形。新合成的细胞壁可以用 0.1%的荧光增白剂 (calcofluor) 染色后在荧光显微镜下观察,可见到绿色荧光围绕细胞的表面,证明细胞壁已经形成。也可用高渗溶液产生质壁分离的方法、电子显微镜观察技术或冰冻蚀刻法等进行再生细胞壁的研究。

电镜观察发现,原生质体培养数小时后新壁开始形成,先是由质膜合成形成细胞壁的主要成分微纤维,然后转移到质膜表面进行聚合作用产生多片层的结构,以后在质膜与片层结构之间或在膜上产生小纤维丝,逐渐形成不定向的纤维团,最后形成完整的细胞壁。只有能形成完好细胞壁的再生细胞,才能进入细胞分裂的阶段。

2. 细胞分裂和生长

原生质体培养数天后,胞质增加,细胞器增殖,RNA、蛋白质及多聚糖合成增加,不久即可发生核的有丝分裂及胞质分裂。原生质体一般培养 2～7 d后开始第一次分裂,但开始第一次分裂的时间随植物的种类、分离原生质体的材料、原生质体的质量、培养基的成分和培养条件而异。用幼苗的下胚轴和子叶、幼根、悬浮培养的细胞和未成熟种子的子叶等为材料分离的原生质体,一般比用叶肉分离的原生质体容易诱导分裂,第一次分裂出现的时间较快。

每个有活力的原生质体都有再生分裂的潜在能力,但是在培养基上能分裂的只是其中的一部分。除植物基因型的差异外,培养基和培养条件也影响原生质体的分裂频率。一般来说,茄科的一些植物种的原生质体分裂频率较高,如烟草可达 80%。

培养一周后再生细胞进行第二次分裂,之后很快进行第三、四次分裂。培养二周后,形成多细胞的细胞团,三周后形成肉眼可见的小细胞克隆,大约六周后形成直径 1mm的小愈伤组织。对大多数植物来说,由细胞系到愈伤组织的培养过程中不需要额外的调整培养基的主要成分,但可以补加一些新鲜培养基。原生质体培养形成小的克隆以后,如果仍然在原来的高渗培养基中培养,生长便会减慢甚至停止,因此,必须转入无甘露醇或山梨醇的培养基上继续培养,使其生长形成愈伤组织或胚状体。

3. 植株再生

原生质体培养形成愈伤组织以后,将其转到分化培养基上诱导器官形成或胚胎发生,使其长成完整植株。形态器官的分化可通过愈伤组织诱导形态发生和胚状体发育成植株两条途径来实现。

通过愈伤组织诱导形态发生的关键是选择合适的培养基和激素,激素的使用遵循细胞和组织培养中激素使用的基本原则。但应注意的是,有些植物细胞本身能合成相当数量的内源激素

如生长素,外加大量生长激素反而不利于细胞的生长和分化。在原生质体培养再生植株的植物种类中,大多数是通过器官发生途径再生植株的,尤其是双子叶植物成功最多的几个科中,如茄科、菊科和十字花科的大多数以及豆科的相当一部分种,均是通过这种途径再生植株。

在原生质体培养中,通过胚胎发生途径再生植株的植物种类,多数集中在禾本科、伞形科、芸香科、葫芦科,豆科中的一部分种尤其是豆科牧草和裸子植物中的松科等。茄科植物中只有少数种通过体细胞胚胎途径再生植株。大多数禾谷类作物的原生质体培养通过体细胞胚发生途径再生植株,这与分离原生质体大多使用幼穗、幼胚或成熟胚建立的胚性愈伤组织或胚性悬浮培养细胞为材料有关。但在使用胚性悬浮培养细胞时,应注意随着继代培养次数的增加,所分离的原生质体形成胚状体的能力会逐步降低甚至丧失。所以,用这种长期继代培养后的培养物分离的原生质体很难再生植株。这可以通过超低温保存技术保存胚性愈伤组织或定期重新建立胚性悬浮培养细胞来克服这一困难。另外,在原生质体培养过程中尽可能地缩短每个环节所需的时间,也是保持分化能力的有效措施。

原生质体的分离、培养和植株再生的全过程如图6.4所示。

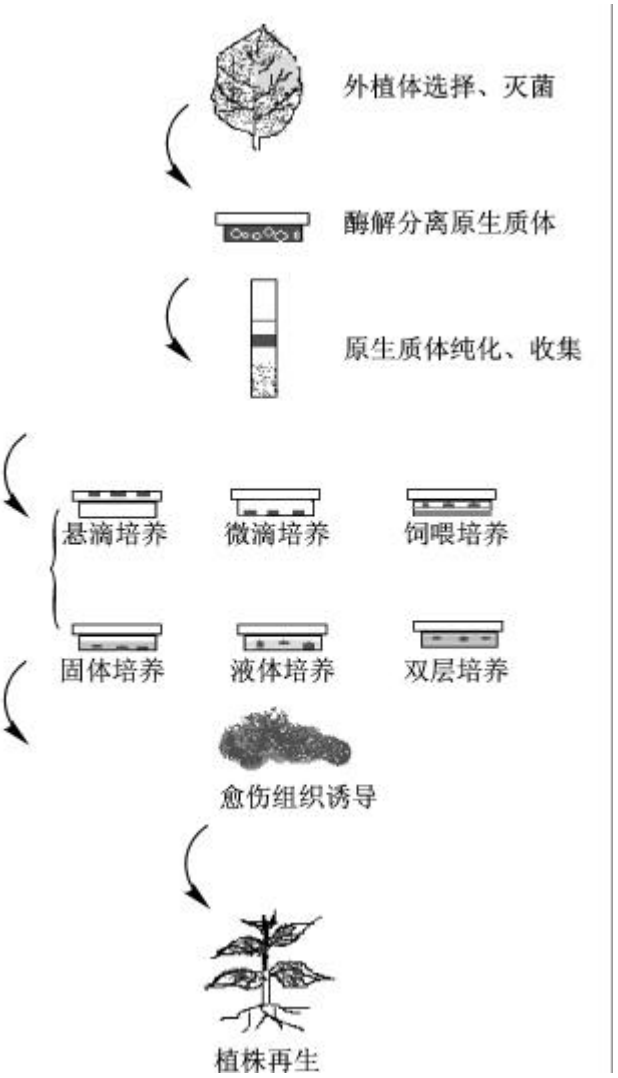


图 6.4 原生质体的分离、培养和植株再生过程示意图

第四节 原生质体再生植株的遗传性状及变异

原生质体再生植株的遗传特性,应该保持其供体植株的基本遗传性状。但原生质体培养与其它植物组织和细胞培养一样,在培养过程中,会发生体细胞无性系变异,从而有可能出现遗传性状变异的再生植株。原生质体又是一个没有细胞壁的裸露细胞,在离体培养条件下更容易受到外界诱变因素的影响,因此,遗传性状也许更易发生变异。

一、再生植株的倍性及染色体数目和结构的变异

原生质体再生植株的倍性与分离原生质体的起始材料有关。一般由茎尖、叶肉和胚性组织的细胞分离的原生质体能较好地保持原来的倍性,而用悬浮培养细胞特别是长期继代培养的细胞系分离的原生质体,较易出现染色体倍性及数目的变化。Grosser等(1984)报道由三叶草叶肉原生质体再生的植株为二倍体(2n=16),而由培养细胞分离的原生质体再生的植株为四倍体(2n=32)。余建明等(1995)对粳型水稻77-170品系原生质体再生植株R_2代96株的根尖染

色体数目进行了鉴定,结果表明,染色体倍性稳定,全部为二倍体。马铃薯原生质体再生植株的染色体变异程度较大。Creisson等 (1985) 测定了 200个马铃薯叶肉原生质体再生植株的染色体数,其中具有正常染色体数 (2n=48) 的植株占 57%,非整倍体植株占 43%,而且还存在染色体结构的变异。Fish等 (1986) 从 178个马铃薯叶肉原生质体再生植株中观察到具正常染色体数 (2n=48) 的植株占 63.6%,非整倍体占 36.4%,其中染色体数接近 48的占 8.4%,接近 96的占 28%。Jones等 (1989) 报道马铃薯原生质体来自块茎的比来自叶肉的非整倍体的比例要高很多。李耿光等 (1992) 研究了马铃薯叶肉原生质体再生植株染色体数目的变化,结果发现,具有正常四倍体染色体数的再生植株频率很低,非整倍体染色体数的植株频率很高,5个再生株系非整倍染色体数细胞所占的百分数分别为 93、74、71、84和 94,而母本植株正常四倍体染色体数的细胞占 79%,也出现少量的非整倍性细胞。

二、再生植株的遗传性状及变异

原生质体再生植株的遗传性状一般与供体材料相同,但在形态学和其它性状方面也会发生一些变异。变异程度的大小与起始材料及培养过程中产生的变异有关。Shepard等 (1980) 研究了由马铃薯栽培品种 RussetBurbank原生质体再生植株的遗传变异,发现有许多性状发生了广泛的变异,其中包括生长习性、熟性、发育特性、块茎性状和抗病性等。通过对 800个原生质体再生植株的无性繁殖系进行试验,结果发现对马铃薯晚疫病的敏感性存在很大的变异范围,而且还从再生植株中筛选到了抗晚疫病的材料,这一特性在几代的无性繁殖中表现稳定。李耿光等 (1992) 对马铃薯栽培品种 (小叶子 ×多子白) 叶肉原生质体再生植株表现型的观察发现,再生植株按形态特征可分为两类:一是外形彼此接近,叶片与母株相似呈卵形,生根正常;二是外部形态特征与母株差异大,彼此之间亦不相似,并且几乎都不能生根。Engler等 (1984) 报道莴苣原生质体再生植株的性状也有变异, 80株再生植株中有 20株育性降低,1株生长势增强,1株成熟期不同,其余的 58株无变异。余建明等 (1995) 对粳型水稻 77-170品系原生质体再生植株 6个株系的 206株后代植株中的 96株 (R_2) 进行了性状观察,发现再生植株子代在株高、剑叶和主穗长、单株有效穗数、每穗粒数、育性和生育期等性状上都产生了变异,但除株高外其它性状在第 2代遗传上不稳定。对 56株子代作了酯酶和过氧化物同工酶鉴定,其酶谱与对照实生株相似。原生质体再生植株中出现白化苗的现象基本上集中在禾本科植物内,这一现象与禾谷类作物花药培养中通常出现高频率的白化苗现象相一致。

造成原生质体再生植株遗传变异的原因有可能是多方面的。其变异有可能来自分离原生质体的植物材料本身所存在的变异,在使用长期无性繁殖的植物材料时也许更容易发生。另外,在原生质体分离和培养过程中,也有可能发生突变。原生质体再生植株的变异可为体细胞遗传学研究和作物改良提供有用的材料和基础。

第五节　性细胞原生质体培养进展

植物细胞包括体细胞和性细胞两大类。目前,体细胞原生质体的研究已日趋成熟,性细胞原生质体培养由于技术上存在许多困难而且难以克服,直到 20世纪 80年代中期后,花粉原生质体

和配子原生质体在分离、培养与融合等方面才开始有所突破。

性细胞原生质体除了具有原生质体的一般特性之外,还具有其特殊的意义。性细胞原生质体为单倍体基因组,其遗传组成单一。它们经历两性分化与一系列的发育程序,由大、小孢子发生,雌、雄配子体发育直至精、卵细胞形成,产生形态与生理各异的多种细胞类型,适应于有性生殖,能通过传粉受精繁殖种子和后代。因此,利用性细胞的特点与有性生殖方式,开展性细胞原生质体的操作与遗传工程,将有可能开拓植物性细胞工程新技术,与体细胞工程相辅相成,使植物生物技术能更加充分地发挥其潜力。植物性细胞的操作,是当前国际上植物生殖生物学与发育生物学的研究热点之一。对性细胞原生质体的研究将有助于人类对植物传宗接代的规律性认识,而且还能为单倍体育种、远缘杂交和基因工程等方面的研究提供不少新的方法和技术手段。

一、花粉原生质体

花粉原生质体具有单倍体和原生质体的双重优点,是植物细胞工程中很有价值的实验体系。花粉原生质体培养的研究始于 20世纪 70年代,Bhogwani等 (1972)首次从烟草花粉四分体分离出原生质体。由于花粉原生质体的分离与体细胞原生质体相比难度更大,这一领域的研究一直进展较慢。从 20世纪 80年代中后期分离出小孢子至成熟阶段的花粉原生质体以来,现仅从单子叶植物中的百合科、鸢尾科、石蒜科和双子叶植物中的芸苔属等的少数植物中成功地分离出花粉原生质体。

1. 花粉原生质体的分离

在被子植物中,花粉母细胞经过减数分裂后形成四分体。四分体被共同的胼胝质壁包围,以后胼胝质壁消失,4个细胞分散成为游离的小孢子,即单核花粉。小孢子被内外两层花粉壁包围,外壁的主要成分是孢粉素,迄今尚无任何酶能够将其降解。内壁的基本成分为纤维素与果胶质,可被常规的细胞壁降解酶所分解。因此,外壁是分离花粉原生质体的主要障碍。目前,在各类花粉原生质体的分离中,针对不同植物与不同发育时期花粉的生物学特点,已创建了以下几种花粉原生质体的分离方法。

(1) 一步酶解法

对于四分体时期的花粉和具有宽大萌发沟的花粉,可用该方法分离原生质体。四分体的胼胝质壁是一种不分支的 β-1,3葡聚糖,用蜗牛酶、纤维素酶和崩溃酶均可降解四分体的胼胝质壁,从而释放出原生质体。对于具有宽大萌发沟的花粉,分离时将花粉置于酶液中,通过水合膨胀作用使外壁沿萌发沟裂开,内壁大面积地暴露在酶的作用之下而降解,使外壁脱落,释放出原生质体。Bhojvani等 (1972)用 1%蜗牛酶处理烟草、矮牵牛等植物的四分体,2.5 h即可产生大量的原生质体。Tanaka等 (1987)将麝香百合近成熟的花粉置于 1%果胶酶和 1%纤维素酶的混合酶液中,在 30℃下酶解 1 h,用培养基洗涤后,铺在用培养基配置的 15% Percoll溶液上离心。一般花粉外壁沉于底部,原生质体漂浮于界面,然后纯化收集原生质体。周嫦 (1988)用类似的方法分离出萱草、鸢尾与风雨花成熟花粉的原生质体和萱草幼嫩的花粉粒原生质体。

花粉原生质体的分离效果受植物的种类、花粉发育的时期和酶的种类及浓度等因素的影响。麝香百合小孢子至二细胞花粉初期均不能分离出原生质体,而接近成熟的花粉原生质体分离率可达 70% ~80%。开花后,分离率又逐渐下降 (Tanaka等,1987)。萱草早中期的小孢子很难分离出原生质体,而从后期开始,原生质体分离效果明显提高,以成熟花粉的分离率最高 (周嫦,

1988)。岳建雄等 (1995)研究了酶的种类及浓度对棉花减数分裂后早期和四分体时期小孢子原生质体分离的影响,结果只有蜗牛酶、崩溃酶可以降解棉花早期小孢子的细胞壁而释放出原生质体,而果胶酶和纤维素酶却不能消化棉花小孢子的壁。在他们的试验中,蜗牛酶优于崩溃酶,其最适浓度为 0.5%。王蒂等 (1999)在马铃薯花粉四分体原生质体分离的研究中也表明蜗牛酶的效果最好。

⑵ 水合 —酶解二步法

这一方法是先将花粉在蔗糖溶液中充分水合,使外壁裂开。有些材料外壁会完全脱落,成为仅具内壁的脱外壁花粉。然后,将其转移到酶液中,降解内壁,从而获得原生质体。

⑶ 萌发 —酶解二步法

首先将成熟花粉置于适宜的花粉萌发培养基中,待花粉大量萌发,从萌发孔或萌发沟长出花粉管时,将其转入酶液中进行酶解。花粉管壁的成分主要为果胶质、纤维素和胼胝质,用细胞壁降解酶可以分解花粉管壁,再扩展至降解花粉内壁,从而释放出原生质体。用此方法曾分离出烟草成熟花粉的原生质体 (Power, 1973;汪泳等, 1995)。另外,朱徵等 (1984, 1985)还先后从金鱼草与烟草花粉管中分离出亚原生质体。

2. 花粉原生质体的培养

花粉原生质体在离体条件下可能有两条发育途径,即孢子体发育途径和配子体发育途径。

⑴ 孢子体发育途径

花粉原生质体在离体培养条件下,偏离体内原有的发育途径,转向脱分化。首先启动细胞分裂,形成多细胞团,进而再生植株。这一途径与花药和花粉培养中雄核发育的途径相似,也是体细胞原生质体培养中常见的途径。一般处于单核中后期至二核早期的幼嫩花粉原生质体具有孢子体发育的潜能。周嫦 (1989)首次报道了萱草幼嫩花粉原生质体培养启动细胞分裂,形成多细胞团,突破了其离体孢子体发育的第一关。其方法是将含单核后期花粉的花蕾经 5～6℃的低温预处理后,将花粉置于含 0.5%纤维素酶和 0.5%果胶酶的酶液中,在 29～30℃下酶解 7 h左右,分离和纯化出原生质体。然后在含有 1 mg/L 2,4—D、2 mg/L NAA、1%小牛血清、1% Polybuffer 74、9%甘露醇和 17%蔗糖的 K3培养基上培养,4～5 d开始第一次分裂,有均等和非均等两种方式,最后逐渐形成多细胞团。岳建雄等 (1995)将棉花减数分裂后早期或四分体时期小孢子的原生质体在含有 0.5 mg/L 2,4—D、1.0 mg/L 2ip、0.5 mg/L KT的 K3培养基中包埋培养,3～4 d开始第一次分裂,形成 2个均等的小细胞,培养 10 d左右,可以看到第二次分裂,形成 4个均等的细胞,但以后不能继续分裂。

⑵ 配子体发育途径

花粉原生质体在离体培养条件下,并不脱分化,而是萌发出花粉管,其中的生殖细胞分裂形成精细胞,表现出体内的配子体发育途径。这是花粉原生质体区别于体细胞原生质体的独特的发育途径。一般成熟花粉原生质体在培养中多表现为这种发育途径。Tanaka等 (1987)和周嫦 (1988)分别报道在麝香百合近成熟花粉与萱草成熟花粉原生质体培养中,观察到细胞壁再生后开始出芽并形成各种管状、念珠状或结节状的结构,生殖核分裂 1～2次,形成了 2～4个精细胞。吴燕等 (1990)将唐菖蒲成熟花粉原生质体培养在附加 0.1 mg/L 2,4—D、1 mg/L NAA、0.2 mg/L BA和 32%蔗糖的 K3培养基上,47% ～59%的花粉原生质体萌发出花粉管。这些花粉管形态正常,生长迅速,花粉管细胞内有活跃的细胞质流动。在花粉管内,生殖细胞分裂形成一对精细胞。

朱徽等 (1984, 1985) 将从金鱼草与烟草花粉管中分离出的亚原生质体培养在 D2 培养基上,无论有核或无核的亚原生质体均能再生厚的细胞壁和管状结构。管状结构生长具有间歇性的特点,因此常呈结节状。

二、配子原生质体

人工分离的生殖细胞、精细胞和卵细胞一般均呈原生质体状态,也可将它们概括地称为配子原生质体。Russell (1986) 首次建立白花丹精细胞的大量分离技术;周嫦等 (1986) 首次用压片分离技术分离出绣球百合的生殖细胞;胡适宜等 (1985) 和李乐工等 (1986) 分别从烟草和番茄中分离出胚囊细胞原生质体。这些研究成果带动了在更多植物中分离配子原生质体的研究,为开展精卵体外融合和植物性细胞工程的研究奠定了基础。

1. 配子原生质体的分离

(1) 生殖细胞与精细胞的分离

生殖细胞与精细胞位于花粉粒或花粉管内,沉浸于营养细胞的细胞质之中,被称为"细胞中的细胞"。生殖细胞的细胞核较大,细胞质与细胞器稀少,核质比很高,类似天然的单倍性的核质体。被子植物的成熟花粉有两种类型,即二细胞花粉和三细胞花粉。在二细胞的花粉营养细胞中含有一个生殖细胞,三细胞花粉的营养细胞中含有一对精细胞。生殖细胞与精细胞的分离方法大致可以分为两类:一是机械分离法。利用机械力量使花粉壁破损,从而获得生殖细胞或精细胞。二是渗透压冲击法。利用低渗溶液使花粉或花粉管尖端破裂,释放出生殖细胞或精细胞。

生殖细胞是精子的前身,被子植物多数为二细胞花粉类型,成熟的二细胞花粉只含有生殖细胞和营养细胞。吴新莉等 (1991) 针对不同植物花粉的生物学特点,研制了分离生殖细胞的 4 种渗透压冲击法。具体为:a 一步渗透压冲击法。将花粉置于低渗蔗糖溶液中保温一段时间后,花粉自行破裂,生殖细胞随营养细胞质流出。花粉在蔗糖溶液中容易破裂的植物如棉花,用该方法可以分离出生殖细胞。b 二步渗透压冲击法。将花粉置于等渗蔗糖溶液中培养,当大部分花粉开始萌发时,加入蒸馏水使渗透压骤降,导致花粉破裂而释放出生殖细胞。一些花粉在蔗糖溶液中不易破裂但易萌发的植物如石蒜、风雨花、玉帘、烟草、凤仙花和蚕豆等用此方法可以分离出生殖细胞。c 低酶法。将花粉置于 0.1% 纤维素酶与 0.1% 果胶酶和低渗蔗糖溶液中保温,促使花粉破裂释放生殖细胞。花粉在蔗糖溶液中既难破裂又不易萌发的植物如黄花菜、韭菜、朱顶红、唐菖蒲和鸢尾等,适于用该方法分离生殖细胞。d 花粉原生质体释放法。首先分离出花粉原生质体,然后用渗透压冲击法或机械法,使花粉原生质体破裂,从而获得生殖细胞。鸢尾、唐菖蒲、黄花菜、韭菜、朱顶红和风雨花也可用此方法分离生殖细胞。在分离生殖细胞时,花粉发育时期、溶液成分、蔗糖浓度、保温时间、加水量和酶浓度等因素均对分离效果有影响,分离方法也可适当调整。

精细胞的分离方法与生殖细胞类似,但二细胞花粉与三细胞花粉精细胞的分离略有不同。二细胞花粉的精细胞是在花粉管中形成的,因此,必须待花粉管生长至适当阶段,生殖细胞已分裂形成一对精细胞以后,才能从花粉管中分离。具体分离时有两种方法:一是活体 - 离体法。首先将花粉授予柱头上,隔一定时间当花粉管中已形成精细胞后,切下花柱,将切口插入液体培养基中。当花粉管由花柱切口中长出后,用渗透压冲击法或酶解法促使花粉管尖端破裂而释放出精细胞。用此方法可以收集大量而纯净的精细胞原生质体。杜鹃花、唐菖蒲、鸢尾、棉花、朱顶

红、烟草、黄花菜、萱草和玉帘等植物采用该方法分离精细胞可取得良好的效果。二是离体萌发法。将花粉置于培养基中进行人工萌发，待生殖细胞在花粉管中分裂形成精细胞之后，用渗透压冲击等方法使花粉管破裂，释放出精细胞。应用该方法时，需注意诱导花粉高频率萌发和同步生长，否则在分离的产物中容易混杂有生殖细胞。

三细胞花粉成熟时已经形成精细胞，可以从花粉粒中分离出来。迄今，大多数实验以此为材料分离精细胞。有两种分离方法：一是研磨法。将悬浮于一定介质中的花粉用玻璃匀浆器轻轻研磨，使花粉壁破裂而释放出精细胞。玉米、油菜、甘蓝、紫菜苔、非洲菊和菠菜曾用此方法分离出精细胞。此方法的优点是操作简便，不太依赖于花粉的成熟度和生理状况。但研磨后的花粉壁碎片较难除去。二是渗透压冲击法。将花粉置于低渗溶液中，使花粉吸水后自行破裂而释放出精细胞。白花丹、玉米、小麦和甜菜等植物比较适用于此方法分离精细胞。该方法的优点是对精细胞的损伤较小，花粉壁较易过滤除去。但花粉的种类、发育时期和生理状况等因素对渗透压冲击的效果影响很大（周嫦等，1989）。

（2）胚囊与卵细胞的分离

发育早期的胚囊以及成熟的胚囊中含有卵细胞、助细胞、中央细胞和反足细胞。卵细胞具单倍性的核和丰富的细胞质；中央细胞较大，内含一对极核或一个次生核和丰富的营养物质；助细胞和反足细胞均为单倍性的核。胚囊位于胚珠内部，被珠被与珠心组织重重包围，胚珠外部又有子房壁包裹。并且，胚囊在数量上也不如花粉那样容易大量收集。因此，从胚囊中分离单倍性的原生质体远比从花粉中分离困难。一般先用人工解剖法除去子房壁，然后以胚珠为单位分离出胚囊，再从胚囊中分离出卵细胞、助细胞、中央细胞和反足细胞的原生质体。具体操作时有以下几种方法：一是酶法。将胚珠置于酶液中酶解，使珠被与珠心细胞离散，裸露出胚囊。一般需在酶解的基础上适当附加机械处理，如吸打、压片或解剖，以提高分离胚囊的效果。我国学者周嫦等（1984，1985）在这一领域进行了大量研究，他们用酶解震荡法先后从向日葵、烟草和金鱼草中分离出生活胚囊。胡适宜等（1985）和李乐工等（1986）也用酶解压片法分离出烟草和颠茄生活胚囊及其成员细胞的原生质体。蓝猪耳、玉米、麝香百合、白花丹和矮牵牛等植物用该方法也能分离出胚囊及其成员细胞的原生质体。另外，孙蒙祥等（1993）还建立了一种新的酶解—渗透压冲击法，能显著地提高烟草生活胚囊的分离效果，进而获得卵细胞等胚囊成员细胞的原生质体。二是解剖法。应用显微操作仪直接解剖胚囊及其成员细胞，但操作比较困难，效率较低。

2. 配子原生质体的培养

生殖细胞在体内条件下被包围在营养细胞内，其本身细胞质稀少，故带有半寄生性质。因此，在离体条件下培养分离的生殖细胞困难较大。吴新莉等（1990）将分离的黄花菜生殖细胞在含多种附加物以及花药作为饲养物的 K3或 MS固体培养基中进行培养，部分细胞可发生 1～2次核分裂，形成 2～4个核的细胞。在总数为 5 961个生殖细胞中，平均分裂率为 3.27%，最高分裂率达 11.46%。个别生殖细胞似乎在核分裂的同时发生了胞质分裂，形成二细胞结构。无论是精、卵体外融合产生的人工合子，还是从体内直接分离的自然合子，由于数目有限，一般采用微培养技术。未受精的胚囊与卵细胞培养迄今未获得成功。傅春梅等（1996）应用微室饲养法培养的烟草合子，可以分裂为二细胞。Mol等（1993）培养带数层珠心组织的玉米受精后胚囊，约 2周后部分外植体内形成不同发育状态的胚。将其从外植体中解剖出来，继续进行胚胎培养，有部分胚能进一步器官分化，少数能再生植株。Holm等（1994）用机械法从解剖下来的大麦胚珠中

分离出受精与未受精的卵细胞原生质体。在培养中,未受精的卵细胞原生质体不能分裂,而受精的卵细胞原生质体几乎全都可以形成细胞团。单独的受精卵培养能够发育成小愈伤组织。用正在进行胚胎发生的大麦小孢子培养物作为饲养物,受精卵能发育成胚状体,并得到可育的再生植株。

第六节 原生质体培养的生理问题

从细胞的角度来看,植物原生质体培养时涉及到许多生理问题,如逆境反应、修复机理、脱分化、细胞分裂以及与形态发生相关的生理现象等。这些均与原生质体分化密切相关,是原生质体培养中需要研究的问题。

一、逆境反应

逆境反应是细胞对外界刺激或诱导,如受伤、感染、高温和辐射等产生的反应。由于细胞壁降解酶是一种逆境诱导剂,可以产生活性氧,引起脂质过氧化,从而减少细胞的流度,同时伴随着胞质膜的渗透性加大。Biedinger等(1991)报道向日葵原生质体的再生能力与此类损伤呈负相关。细胞对这些逆境的反应一般会快速地产生涉及诱发不同代谢途径的酶系统,结果形成植物抗毒素和如木质素类结构的多聚物。Criqui等(1991)报道在分离原生质体时,编码泛素蛋白(ubiquitin protein)、类伸展素蛋白(extensin-like protein)、过氧化物酶和蛋白酶抑制物的基因立即活化。Meyers等(1991)还报道刚分离的烟草原生质体会产生2个几丁质酶、2个渗透蛋白和1个葡聚糖酶。有些逆境反应对原生质体的制备是不利的。在甜菜原生质体制备时,原生质体的脂肪氧合酶(lipoxygenase)活性增加,形成类脂过氧化物(lipid peroxides),结果会引起原生质膜的氧化损伤。在马铃薯原生质体分离时,产生的乙烯会影响原生质体的活力。由此可见,原生质体在分离过程中产生逆境反应的性质是决定以后在培养中其全能性能否进一步表达的重要因子之一。

二、修复机理

在原生质体分离时会丢失一些不同的细胞结构。最明显的当然是失去了细胞壁。细胞壁是保持细胞形态和功能的重要因子,失去细胞壁以后使原生质体中细胞骨架的组分、结构和方向发生变化,最常见的是引起细胞极性的改变(Simmond, 1991),同时也会干扰质膜的蛋白质系统。质膜含有蛋白质复合体,其作用是有机物的运输、有选择性地允许离子进出细胞和识别各种外来的信号。原生质体分离时用于脱壁的酶中多少都杂有蛋白酶,因此,会对膜蛋白造成部分损伤,分离的原生质体只有在重新合成这些蛋白质复合体后才能具有活性功能。各类原生质体修复其质膜及其中的蛋白质组分的能力,细胞壁再生的能力及细胞骨架的修复和调整能力都对它们能否进一步发育有很大影响。

三、脱分化

分离的原生质体其原来的细胞状态常常会影响脱分化的进行。例如,马铃薯组织的原生质

体含有大量的淀粉体,只有当这些淀粉体被代谢了以后才能见到细胞分裂,这个过程需要 7 d左右才能完成。因此,在分离原生质体之前,若能通过处理使细胞内的淀粉含量减少或消失,则可以大大促进脱分化的进程。叶肉原生质体通常含有许多叶绿体,培养过程中叶绿体表现出明显的变化并逐渐消失。在烟草原生质体培养中观察到,细胞在培养初期发生一系列变化,如液泡消失、细胞体积增加、细胞质变浓和核蛋白体增加等。与此同时,细胞的 DNA 开始复制,随后染色质变浓,原生质体脱分化成为类似于分生组织状态的细胞。脱分化过程中的这些生理变化都是原生质体分化所必需的,但其生理学机制尚不完全明了。

四、细胞分裂与分化

细胞骨架联系着细胞内各细胞器和其它胞质组分以及质膜,细胞壁和细胞骨架与细胞分裂和分化密切相关。由于微管参与细胞形状的调节,决定细胞板形成的位置,因此微管在植物形态建成中起着重要的作用。由于原生质体系统避免了细胞间的影响,而且在培养条件下可以系统地掌握细胞所处的环境,因此对研究微管的结构十分有利。同时,原生质体在去掉细胞壁以后又能再生新的壁,从而为研究细胞壁与质膜和微管之间的关系提供了条件。Akashi等 (1991) 以烟草原生质体的研究证明了细胞壁可以稳定皮层微管。一般的微管对低温比较敏感,而当烟草原生质体再生细胞壁时,其皮层微管耐低温的能力提高,说明细胞壁与这些微管组织的低温敏感性密切相关。

通过原生质体培养系统还可以探讨细胞如何从静止期 (G_0) 转入细胞周期的 G_1、S和 G_2 期再到 M期。在此基础上,可以进一步研究细胞分化和形态发生过程及其调控。据研究,一个原生质体能否进入细胞分裂还依赖于所处的细胞周期。Firoozabady等 (1986) 研究认为,当棉花细胞处于 G_2 期或 S期到 G_2 期之间时,有利于原生质体的细胞壁再生和细胞分裂;而当细胞处于 G_1 期时,则不利于原生质体的细胞壁再生和细胞分裂。随着幼苗苗龄的增加,其子叶中处于 G_0 期和 G_1 期的细胞比例也增加,因而以子叶游离原生质体时,应使用较小苗龄的子叶。

五、再生细胞壁

细胞壁是高等植物细胞特有的结构之一,具有多种功能。细胞壁对细胞不仅起保护作用,而且还参与细胞的生长、分化等生命活动。原生质体是人为除去了细胞壁的裸露细胞,经离体培养又可以再生新的细胞壁。因此,原生质体是研究细胞壁物质的生物合成与其分泌过程的良好系统,特别是研究纤维素微纤丝沉积机理的理想材料。

原生质体再生细胞壁的早期只产生少量的纤维素,而且纤维素多聚化程度也较起始组织低。培养的原生质体在细胞壁形成初期常有多糖释放到胞外而降解,但随着培养时间的加长,用于细胞壁形成的多糖量增加,丢失的量相对减少。刚制备的原生质体表面常常没有纤维素这类物质,经过不同的迟滞期后开始有松散的微纤丝形成。随着培养时间的增长,微纤丝的数量迅速增多,围绕着原生质体形成一浓密的网络。根据生化分析和超微结构观察,烟草和大豆等原生质体所形成的微纤丝的主要成分是纤维素,微纤丝的直径为 1.2～15 nm,也有的达到 40 nm。

六、原生质体出芽

有许多研究者曾报道在原生质体培养中有原生质体出芽现象。Bawa等 (1971) 报道从田旋

花 (*Convolvulus arvensis*) 愈伤组织和根分离的原生质体,在培养过程中有出芽现象的发生。原生质体在刚开始培养的几天中,形成了新的细胞壁,培养 10～14 d以后,细胞壁的一部分变弱,有许多原生质体出现了细胞质的局部膨胀,由于细胞的内压而使细胞质突出呈芽状并在芽的周围有新的细胞壁形成,俗称“出芽”。细胞质突出的部分与原来的细胞之间有一细胞质连丝,使芽与原来的细胞相连。在胞质连丝断裂的情况下,芽也可能与原来的细胞分离。一个原生质体的这种出芽过程有时可连续重复 3～4次。在出芽的原生质体中,有时还能观察到核的数目增加,原来的细胞一般只有 1个核,而在一些情况下有的芽也有 1个核。1个新发育的芽偶然会破裂,这样细胞质就会缩回到原来的细胞中。

一般认为出芽现象与培养基成分有密切的关系,而且认为出芽对细胞分裂不利。为了避免出芽,往往需要降低培养基中水解酪蛋白的含量。但在孙勇如等 (1979) 的实验中却发现,分裂频率高的培养基其出芽的原生质体的比例也高。从他们的实验结果看来,出芽并不影响原生质体再生细胞的分裂。他们认为,出芽可能是原生质体对于培养环境的一种生理上的适应。

七、内吞作用和液泡

原生质体可用于研究细胞生物学中的一些基础问题,如内吞作用 (endocytosis)。植物细胞由于细胞壁的存在,限制了大分子物质通过内吞作用进入质膜,使得很难开展对内吞作用的研究。而原生质体去除了细胞壁的障碍,为内吞作用研究提供了良好的试验基础。

在光学显微镜下可以用荧光染料法来研究细胞的内吞作用。许多研究利用一种称为荧光黄 (lucifer yellow) 的物质,研究它的摄入和它在液泡中的集聚,但其机理尚不清楚。

在透射电子显微镜下可以采用密电子探针 (electron dense probe) 法,例如,用 CF (cationized ferritin,阳离子铁蛋白) 或胶体金 (colloided gold) 作为探针研究细胞的内吞作用,效果甚好。通过对大豆原生质体的观察表明,原生质体的质膜首先内陷形成皮层小孔 (CP),然后形成膜包小泡 (CV),膜包小泡再将 CF摄入局部包被的内质网 (partially coated reticulum, PCR)。其后可能有两条途径:一是将 CF转入高尔基体,有可能再形成小泡输出膜外;另一途径是将其转入多泡体 (multi-vesicular bodies, MVB),最后运到液泡使之降解。对于植物细胞内吞作用的机制,目前仍处于探索阶段,上述途径亦需更多试验才能证明。此外也有报道,相对分子质量达 450×10^3 的阳离子铁蛋白可经内吞作用进入大豆或菜豆原生质体。玉米根冠细胞可通过质膜内吞作用摄入多种重金属 (La, Pb) 化合物,检测到的 La主要局限于高尔基体囊泡内,而 Pb则在内质网和液泡内均有分布。

具有明显的液泡是植物细胞的一个特点。液泡还可以进行细胞的一些重要功能,如暂时或永久贮存一些有毒物质或其它降解物。液泡中的溶质与渗透压有关,也是某些酶、无机分子、代谢中间体和次生代谢产物的贮存库。但液泡的一些特性对开展某些研究不利,它们的自噬作用有时会使外来物质难以在细胞中起作用,当细胞识别这些物质是外来的,就会将它运到液泡中。此外,细胞的衰老开始就是引起液泡膜变化,使之释放出水解酶而引起自融。有鉴于此,一些科学工作者就研究了如何将原生质体的液泡除去,得到无液泡的原生质体。这个系统对于细胞分裂、遗传转化或其它涉及原生质体的研究都是十分重要的。近年来,用纯化的原生质体悬浮液与含有 HEPES、$CaCl_2$ 以及甘露醇的溶液混合,再通过超速离心,使去除液泡的原生质体形成一条带,这样已经得到了矮牵牛或拟矮牵牛 (*Petunia parodi*) 的全部去液泡叶肉原生质体。这些原生质体都没有大的中

央液泡,成活率为 40%。它们在合适的培养基上 17 h内能重新形成新的液泡,1～2周原生质体可进行细胞分裂并继续生长,经培养得到的再生植株与对照没有明显差异。如果用悬浮培养的细胞制备原生质体再使之去液泡,则由于原来无性系的细胞状态不同,可以得到 3类去液泡的原生质体。第一类是没有液泡但有细胞核和少量细胞质的原生质体,这一类型可称之为核质体(nucleoplast);第二类是既没有液泡也没有细胞核的原生质体,称为胞质体(cytoplast);第三类是有细胞核而且保留了一些类型的液泡,通常称之为微小原生质体(miniprotoplast)。也有人将核质体和胞质体都归于微小原生质体一类,以和完整的原生质体相区别。一般从悬浮培养制备可得到 35%左右的去液泡原生质体。胞质体在离体培养 48 h后很难继续成活,而微小原生质体与核质体有 20% ～50%可以离体培养成活,且微小原生质体要比核质体的存活率要高。去除液泡的叶肉原生质体可较为方便地用于微注射,它们对诱变剂及其它有毒物质更加敏感。由于液泡膜在积累、贮存花青素中起重要作用,去液泡的叶肉原生质体培养时要经过 17 h其再生的液泡才能逐步恢复功能。

八、气孔生理

以保卫细胞的原生质体作为试验系统,在气孔生理研究方面有较大的潜力。因为这类原生质体是一个细胞群体和改进了的离体细胞系统,可以进行在组织水平上难以或不可能进行的试验。专门分离的保卫细胞的原生质体纯度较高,可用于这类细胞对一些条件的反应能力的专门研究。更为重要的是,利用保卫细胞的原生质体可以直接研究保卫细胞的细胞壁在气孔运动中的作用。由于组织培养条件提供了对保卫细胞研究可控制的微环境,因此,可以获得比较精确的数据,如体积变化、渗透参数等。

已有试验证明,洋葱、蚕豆的保卫细胞原生质体对光能发生膨胀反应,并发现在低光子流密度下,蓝光的效应显著,而红光无效。如果培养基中有 KCl存在时用白光处理,能使这一膨胀反应加强。利用鸭跖草的叶肉细胞在不同光质下进行预培养,再提取其上清液来培养保卫细胞原生质体。结果发现,白光下培养所提取的上清液对保卫细胞原生质体的膨胀有促进作用,而红光下预培养的叶肉细胞上清液则能在黑暗条件下引起原生质体的膨胀。试验结果提示,鸭跖草的叶肉细胞可能产生一种化合物促使分离的保卫细胞原生质体膨胀,此化合物只有当叶肉细胞在白光或红光下才出现,而在蓝光或黑暗中不出现。虽然这种化合物由叶肉细胞产生,但由于其具有可溶性,因而可转入保卫细胞原生质体。

另一些试验证明,蓝光诱导的蚕豆保卫细胞原生质体膨胀可为低氧条件所抑制,因为此时从原生质体提取的 ATP降低了约 64%。如果此时增加供氧到近饱和水平,经 60 min后原生质体又可膨胀。由此可见,保卫细胞的叶绿体和线粒体可经蓝光诱导的质子泵对其原生质体提供能量。因为这两个能源都可受低浓度氧的控制,可以认为,此现象是保卫细胞中光合磷酸化和氧化磷酸化的协同调节代谢的结果。

在保卫细胞原生质体研究中,有人用一种透析膜将其与外面的等渗溶液隔开,使保卫细胞原生质体不受损伤。试验表明,只有在保卫细胞原生质体悬浮液也有 K^+存在时,才能观察到保卫细胞原生质体的体积增大。这说明 CO_2 可能影响 K^+对保卫细胞原生质体的渗透调节。保卫细胞对 K^+的吸收与释放,保卫细胞原生质体的叶绿体中 ATP合成和光合碳代谢的变化等均可利用原生质体系统开展研究。应当指出的是,在制备保卫细胞原生质体时,质壁分离和脱壁用的酶制剂也可能对其生理功能产生影响,不应忽视。而保卫细胞原生质体由于没有细胞壁,与原来有

壁的保卫细胞在功能上是否有差异,仍值得进行深入研究。尽管如此,保卫细胞原生质体已为研究气孔生理开辟了一条新的途径。

第七节 原生质体培养的应用

植物原生质体由于除去了细胞壁,并且在离体培养条件下能够实现细胞的全能性而再生植株,因此,可以作为一个良好的实验系统而用于细胞壁的形成与功能,质膜的结构与功能,细胞骨架,细胞分化与脱分化等基础理论问题的研究。同时,原生质体容易摄取外源 DNA、染色体、细菌、病毒、细胞器和质粒等,从而为高等植物细胞水平和分子水平的遗传操作提供理想的实验体系。原生质体还可以应用于体细胞杂交、无性系变异及突变体的筛选、细胞器的分离等研究。因此,原生质体可以为植物生理学、分子生物学、遗传学、病理学、病毒学、育种学、体细胞遗传学和实验生物学等学科的理论和应用研究提供重要的实验体系。植物原生质体培养已成为现代生命科学的一个重要研究领域。

一、基础理论研究的实验系统

自从用酶法分离植物原生质体获得成功以来,原生质体已成为一种良好的实验系统而广泛地应用于现代生命科学的研究中。脱去了细胞壁的原生质体具有完整细胞除细胞壁以外的全部功能,因此,利用原生质体系统便于开展因细胞壁存在而难以进行的一些研究。

在基础理论研究方面,原生质体可作为一个单细胞系统来研究细胞壁的再生,细胞膜的透性及离子转运,细胞分裂、分化,摄入细胞器和病毒侵染等问题。用保卫细胞的原生质体还可以研究气孔开关的机理;用原生质体制备膜包小泡,可以研究物质运输;用原生质体制备液泡,可以研究物质的贮存;用原生质体制备染色体,可以研究其结构与功能。

原生质体可以提供一个均一的细胞群体,从而便于进行各种试验处理,如激素、诱变剂和抑制剂的处理等。原生质体对处理的反应比完整的细胞要灵敏、迅速,因此,可以用低浓度或低强度的理化因素来处理原生质体。

性细胞原生质体由于具有单倍性与原生质体的双重优点,在植物生殖生物学和发育生物学的研究中具有重要的意义。利用性细胞原生质体,有助于研究花粉离体发育途径的机理,花粉发育过程中细胞骨架的演变,花粉壁的形成,花粉膜的结构与功能,花粉萌发的机理,生殖细胞与精子的变形及细胞骨架的变化,生殖细胞分裂成精子的机理,精子的识别物质,精卵细胞体外融合及培养等问题。此外,利用原生质体的超低温保存,还可研究细胞膜的低温伤害机理和细胞内结冰等理论问题。

二、体细胞杂交

植物原生质体由于除去了细胞壁,因此,可以用人工的方法诱导融合,从而进一步获得体细胞杂种。应用体细胞杂交技术可以获得常规有性杂交不亲和物种间的杂种植株,从而实现远缘物种和近缘栽培种遗传物质向栽培种的转移,并从其后代中选育出新品种(系)。另外,通过体细胞杂交技术还可转移细胞质雄性不育基因,从而为农作物的遗传改良提供新的途径和方法。

关于体细胞杂交将在第七章中详细讨论。

三、作为遗传转化的受体

原生质体由于没有细胞壁的障碍,使之易于从外界摄取 DNA、染色体、细菌、病毒、细胞器和质粒等,从而为植物的遗传转化创造了有利条件。另外,在短时间内可以获得大量遗传上一致的原生质体群体,提供平行条件下的遗传转化受体。在人工控制的条件下,还能够以单个原生质体进行准确的遗传操作,避免出现利用其它材料所常见的嵌合现象。因此,原生质体已成为遗传工程中比较理想的受体之一,开始用于植物基因工程的研究。在利用原生质体进行遗传转化时,可以采用 PEG法、电穿孔法、脂质体法、基因枪法、显微注射法和农杆菌与原生质体共培养法进行基因转移,从而为基因工程的研究和农作物的遗传改良服务。此外,原生质体还可用于基因瞬间表达系统的研究。原生质体作为瞬间表达系统,特别适用于利用报告基因来研究特定基因 5和3端不同顺序在相应基因表达中的作用,而且瞬间表达系统本身也为研究影响外源 DNA导入的因素,设计新的导入方法和构建能在植物细胞中高效表达的载体等提供了快速有效的检测系统。

四、无性系变异及突变体的筛选

原生质体培养与其它组织和细胞培养一样,在培养过程中会产生无性系的变异。因为没有细胞壁,原生质体对外界理化因子更为敏感,更容易诱发产生突变,且产生的突变不会因正常细胞的生长而掩盖。一旦筛选出优良的突变体,便可很快地为农业生产实践服务。

五、分离细胞器的理想材料

最早的细胞器分离一般采用机械法破碎细胞,这样容易造成细胞器的破碎。如果用原生质体作为材料,在温和的条件下就能破碎质膜,从而释放出来的细胞器会非常完整。原生质体已广泛用于叶绿体、线粒体、细胞核,以至染色体的分离。这对于研究这些细胞器的结构、功能和生理生化特性,以及进行分子生物学的分析提供了极为有利的条件。

思考题

1. 原生质体、亚原生质体、微小原生质体和原生质球的概念。
2. 为什么原生质体要培养在等渗培养基中?
3. 影响原生质体培养的主要因素。
4. 原生质体的培养方法有哪些?各有何优缺点。
5. 性细胞原生质体的种类、分化途径及应用领域。
6. 为什么说原生质体培养系统是现代生物技术的载体?

第七章

植物体细胞杂交

植物有性杂交在品种选育上已广泛应用,但远缘杂交不亲和现象普遍存在,限制了近缘种和野生种优良基因的利用。而体系胞杂交则是通过细胞融合,使得远缘个体间的基因组能够整合,导致有性杂交条件下所不能实现的基因重组,从而创造新的遗传变异,新的育种材料,甚至新物种。

第一节 植物体细胞杂交的概念

植物体细胞杂交 (somatic hybridization)又称为原生质体融合 (protoplast fusion),是指将植物不同种、属,甚至科间的原生质体通过人工方法诱导融合,然后进行离体培养,使其再生杂种植株的技术。植物细胞具有细胞壁,没有去壁的细胞是很难融合的。因此,植物的体系胞杂交或融合是在原生质体状态下实现的,它是以原生质体培养技术为基础,在动物细胞融合方法的基础上发展起来的一门新型生物技术。原生质体融合过程包括原生质体的制备、细胞融合的诱导、杂种细胞的筛选和培养,以及杂种植株的再生和鉴定等环节。

目前已有许多种内、种间、属间甚至科间的体细胞杂交获得杂种细胞系或杂种植株,其中有的已用于生产。早期的体细胞杂交主要集中在茄科植物中。近年来,随着植物原生质体培养技术的迅速发展,尤其是禾本科和豆科等重要粮食作物原生质体操作关键技术的突破,这两类作物的体细胞杂交也相继产生了越来越多的体细胞种间或属间杂种。木本植物如柑橘等也获得了远缘杂种再生植株。

一、植物原生质体融合技术的发展

植物体细胞杂交技术兴起于 20世纪 70年代,历经 30多年的发展,无论在应用研究还是在操作技术上都取得了长足的进展。自从 1972年 Carlson等获得第一株烟草体细胞杂种植株以来,许多植物的种内、种间、属间甚至科间的体细胞杂交已获得了杂种细胞系或杂种植株,其中一些是至今不能用有性杂交方法获得的杂种组合,而且有一些体细胞杂种已开始应用于育种实践中。早期的体细胞杂交主要集中在茄科植物包括烟草属、曼陀罗属、矮牵牛属、茄属、番茄属和颠茄属等,此后主要应用于十字花科的芸苔属和拟南芥属,以及伞形科的胡萝卜属和欧芹属等。近年来,随着植物原生质体培养技术的迅速发展,尤其是禾本科和豆科等重要粮食作物原生质体培养技术的重大突破,其体细胞杂交也产生了种间和属间杂种。另外,一些木本植物的体细胞杂交也再生了杂种植株。

植物原生质体融合的发展历史起始于原生质体的分离成功。在原生质体植株再生技术研究

的同时,科学界一直注重原生质体的应用领域和相关技术研究,其中最重要的是能创造新物种的原生质体融合技术研究。在植物体细胞杂交研究的发展过程中,有下列一些里程碑式的重要事件:

1960年,Cocking首次用酶解法从番茄根中大量分离原生质体获得成功;

1970年,Power首次用硝酸钠为诱导剂进行了较大规模的原生质体诱导融合;

1971年,Takebe等首次用烟草叶肉原生质体培养获得再生植株;

1972年,Carlson等获得第一株烟草体细胞杂种植株;

1974年,Kao等建立高频率诱导原生质体融合的聚乙二醇(PEG)法;

1978年,Melcher等获得马铃薯和番茄的第一个属间体细胞杂种;

1979年、1981年,Senda等和 Zimmermann等发展了广泛使用的电融合法;

1987年,Schweiger建立了单对原生质体电融合技术程序;

1990年,来源于体细胞杂交的第一个商品化的烟草栽培品种释放;

1995年,Makankawkeyoon等获得引入老鼠免疫球蛋白 G的第一个烟草 -老鼠杂种植物。

随着原生质体培养技术逐渐的程序化和系统化,植物体细胞杂交技术已日渐成熟,对体细胞杂交的亲本组合已开始有目的地进行选择,诱导融合的方法和技术进行了改进和提高,选择杂种细胞和鉴定杂种植株的方法有了极大的发展,而且还开始了配子 -体细胞杂交(gameto-somatic hybridization)和配子间的原生质体融合,并获得了部分杂种植株。体细胞杂交作为一种育种的新途径,将会有效地应用于作物的遗传改良和新品种的选育,从而为生产实践服务。

二、植物细胞杂交的类型

原生质体融合的过程完全是人为的诱导过程。从理论上说,任何细胞,不论是完整原生质体还是亚原生质体,是单倍体还是二倍体,是分化细胞还是未分化细胞,都有可能通过体细胞杂交而成为新的生物资源。例如,丧失形态发生能力的细胞可通过与胚性细胞融合,其再生杂种植株可重返有性世代,这对于种质资源的开发和利用具有深远的意义。另一方面,体细胞融合过程不存在有性杂交过程中的种性隔离机制的限制,这就为远缘物种间的遗传物质交换提供了有效途径。同时,体细胞杂交产生的杂种细胞含有来自双亲的核外遗传系统,在杂种的分裂和增殖过程中,双亲的叶绿体、线粒体 DNA亦可发生重组,从而产生新的核外遗传系统,这是有性杂交根本不可能实现的。

1. 植物细胞杂交的类型

植物细胞杂交根据所选用亲本原生质体的来源可分为以下 4种类型。

(1) 体细胞杂交

体细胞杂交是用双亲的体细胞原生质体进行融合,然后进行培养、筛选和鉴定,从而获得杂种植株的过程。体细胞杂交是一种最常用的细胞杂交技术,目前所进行的植物原生质体融合的大多数组合仍以体细胞杂交为主。

(2) 配子 -体细胞杂交

配子 -体细胞杂交所选用的融合亲本一个为体细胞原生质体,一个为性细胞原生质体。近年来,随着性细胞原生质体分离和培养取得进展,体细胞和性细胞之间的原生质体融合研究已逐渐开始。用分离的精、卵细胞原生质体与体细胞原生质体融合,可获得三倍体细胞杂种。

⑶ 配子间细胞杂交

配子间细胞杂交所选用的融合亲本均为性细胞原生质体。配子间细胞杂交有多种组合形式,其中以精、卵细胞融合进展最快。国际上首次获得成功的是玉米精、卵细胞的体外融合并再生了杂种植株。精、卵细胞体外融合的成功,标志着高等植物受精过程的研究从此可以置于人工控制的离体条件下进行。

⑷ 微细胞杂交

微细胞杂交 (microcell hybridization) 是先用一些处理来诱导细胞中形成高频率的微核,再分离和制备具有此微核的原生质体 (micronucleated protoplast),然后用它们作为融合的亲本而进行的细胞杂交。具有微核的原生质体又叫微原生质体 (microprotoplast),与微小原生质体 (miniprotoplast) 的不同之处在于已经进行了微核化处理。微细胞杂交主要用于转移单个完整的染色体以建立单体或多体的“染色体杂种”,从而进一步地用于基因图谱的绘制等分子生物学的研究。

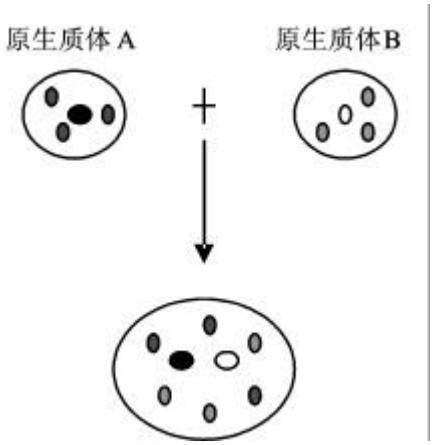


图 7.1 对称融合示意图

2. 原生质体融合的种类

原生质体融合根据其细胞融合时的完整程度可以分为两大类。

⑴ 对称融合

对称融合 (symmetric fusion) 是指两个完整的细胞原生质体融合,在融合子中包含有两个融合亲本的全套染色体和全部的细胞质 (图 7.1)。

⑵ 非对称融合

非对称融合 (asymmetric fusion) 是指利用物理或化学方法使某亲本的核或细胞质失活后再进行融合。它可以分为 3种:a. A细胞核 +B细胞质;b. A完整细胞 +B细胞质;c. A完整细胞 +B细胞质和部分核物质 (图 7.2)。

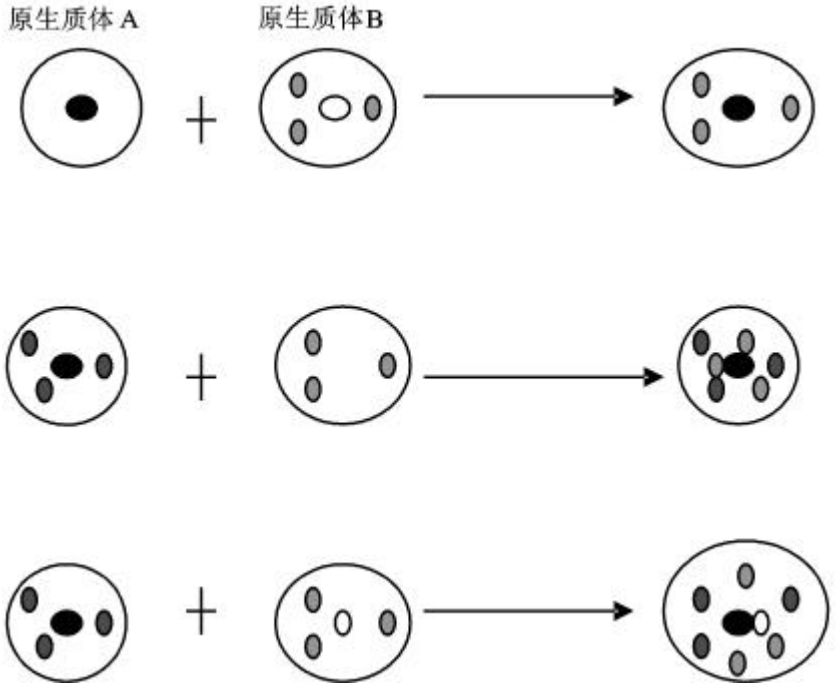


图 7.2 非对称融合示意图

用于使细胞核或细胞质失活的方法有物理和化学两大类。物理方法常采用射线处理，如 X 射线、γ射线等，它们能使细胞核失活。化学处理目前常用的试剂有：

核失活：碘乙酰胺（IDA）、碘乙酸（iodoacetate）；

质失活：罗丹明（R－6－G），它是一种亲脂染料，能够抑制线粒体的氧化磷酸化过程从而达到使细胞质失活的作用。

第二节　原生质体融合

一、融合方法

原生质体融合可以是自发融合（spontaneous fusion），也可以是诱导融合（induced fusion）。自发融合往往发生在原生质体分离的过程中，也是原生质体的一个基本特性。正是由于这一特性，使得原生质体的诱导融合成为可能。

诱导原生质体融合的方法很多，均是在长期的试验探索中建立起来的。使用的化学诱导融合方法有：a. $NaNO_3$ 融合法。这是由 Power 等（1970）首次创造的方法。他们在培养基中加入 $NaNO_3$，诱导了玉米和燕麦原生质体的融合。但由于 $NaNO_3$ 对细胞有毒害作用，这种方法的融合效率较低，尤其是叶肉原生质体融合的效果更不理想。b. 多聚化合物法。通过在培养基中加入多聚－L－鸟氨酸、多聚－L－赖氨酸、葡聚糖硫酸盐等多聚化合物，改变原生质体表面的物理特性，从而增强原生质体的内吞作用，促进原生质体融合。c. 高 pH、高 Ca^{2+} 法。该方法首先由 Keller 和 Melkers（1973）报道。他们通过在 pH 10.5 的条件下，使用 0.05 mol/L 的 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 诱导烟草原生质体发生了融合并获得再生植株。d. 聚二乙醇（PEG）法，这是由 Kao 和 Michayluk（1974）以及 Wallin 等（1974）创造的方法，下面将作详细介绍。使用的物理诱导融合法主要是电融合法。由于相关技术的不断完善，许多新的高效融合技术体系不断完善，因而一些老的融合方法已逐渐淘汰。以下我们仅就目前应用广泛的 PEG 诱导融合法和电融合法进行介绍和讨论。

1. PEG 诱导融合法

原生质体诱导融合普遍采用的化学方法是聚乙二醇法，该方法由 Kao 等（1974）建立。PEG 即聚乙二醇（polyethylene glycol），其分子式为 $HOCH_2(CH_2-O-CH_2)_nCH_2OH$。用于诱导原生质体融合的 PEG 相对分子质量一般在 1 500～7 500 之间。试验证明，PEG 是一种高效融合剂。其优点是融合成本低，不需特殊设备；融合子产生的异核率较高；融合过程不受物种限制。其缺点是融合过程繁琐，PEG 可能对细胞有毒害作用。

(1) PEG 的作用机理

PEG 的高效诱导融合的结果是公认的，但对于其真正的作用机理人们目前并不十分清楚。原生质体表面带有 －10～－30 mV 的负电荷。因为电荷性质相同，两个相邻的原生质体的质膜不可能紧密接触，所以，在没有外界作用的条件下原生质体很难发生融合。一般认为，原生质体融合首先必须使两个原生质体紧密接触，质膜之间的距离要小于 10?。由于 PEG 分子有带负电荷的醚键，具有轻微的负极性，故可以与具有正极性基团的水、蛋白质和碳水化合物等形成氢键，在原生质体之间形成分子桥，其结果是使原生质体发生黏连。当用高 Ca^{2+} 和高 pH 溶液清洗后，

Ca^{2+}和 PEG被清洗掉,打破了电荷平衡,使原生质体的某些正电荷与另一些原生质体的负电荷连接起来,进而促使原生质体的融合。另外,PEG能增加类脂膜的流动性,这也使原生质体的核和细胞器发生融合成为可能。

⑵ PEG融合的技术要点

PEG相对分子质量的大小与融合效率的关系很大。市售的 PEG相对分子质量一般有1 500,1 540,4 000,6 000,8 000等,以相对分子质量为 6 000的应用较多,融合效果较好。PEG融合过程中需注意的技术要点如下。

① 融合液配制 融合液分为 A液和 B液,在不同的融合阶段使用。A液的 Ca^{2+}浓度和 pH较 B液低,具体配方为:

A液: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2~8 mmol/L
KH_2PO_4	0.5~0.7 mmol/L
甘露醇或山梨醇	0.1~0.2 mol/L
PEG	25%~30%
pH	5.8

B液:$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	10~100 mmol/L
KH_2PO_4	0.5~0.7 mmol/L
甘露醇或山梨醇	低渗或不加
pH	7.0~10

A液和 B液均可进行高温灭菌。但有研究认为,A液最好采用过滤灭菌,因为高温灭菌可能降低 pH,也会分解 PEG中的氢过氧化物而产生醛或酮,进而使之氧化成酸,对细胞产生伤害。Chand等 (1988)的研究证明,经高温处理,A液中的羧基含量较原先要增加几倍到十几倍。另外,PEG的存放时间和 A液中的 pH均会影响羧基的含量,以新配制的 PEG和 pH 5.8时的羧基含量最低 (约 0.5×10^{-4} mol/L)。

为减少融合液对原生质体的伤害,有的试验在 A液中添加细胞膜保护剂如牛血清蛋白,用量一般为 0.2%。但也有研究认为添加细胞膜保护剂作用不明显。

② 融合原生质体的密度和比例 原生质体分离后,先用不加 PEG的融合液 A洗一次,然后将密度调整到 1×10^5 原生质体/ml左右,再将两亲本原生质体按 1∶1混合,静置 2 min后即可开始融合过程。

③ 原生质体融合方式 原生质体的融合方式有 3种:一是将待融合的原生质体的悬浮液均匀地滴于培养皿底部,然后在培养皿中加入约 2 ml融合液 A (图 7.3a);二是在两原生质体悬浮液滴中间加一滴融合液 A (图 7.3b);三是在原生质体悬浮液滴顶部加一滴融合液 A (图 7.3c)。许多研究均认为以第三种方式较好,融合效率较高。

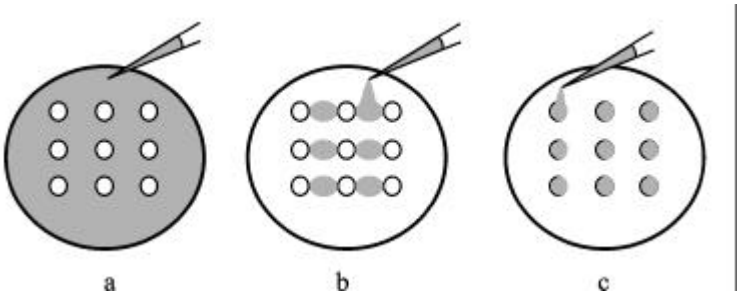


图 7.3 PEG融合方法

④ 融合步骤 以图 7.3c中的方法为例,首先,将原生质体悬浮液均匀滴于培养皿底部,静置 3~5 min待细胞沉降;然后,在原生质体

悬浮液滴顶部缓慢加一滴融合液 A,处理 15～20 min,待大多数细胞圆球化;再在原生质体悬浮液滴顶部加一滴融合液 B,静置 10～20 min;随后,用原生质体培养液洗涤,500 r/m离心去除融合液;最后,按前述的原生质体培养方法进行培养。

2. 电融合法

(1) 电融合原理

电融合 (electric fusion)是 20世纪 70年代末 80年代初发展起来的一项新的融合技术。与 PEG融合比较起来,电融合有三大优点:一是不存在对细胞的毒害问题;二是融合效率高;三是融合技术操作简便。但电融合要求比较昂贵的仪器,给融合技术的实际应用带来一定的限制。

电融合仪是根据原生质体的融合过程设计的,实质上它是借助于电场和电脉冲的作用来加速原生质体的融合过程,即给予了原生质体融合一个更有利的外部条件。目前,电融合仪的种类有几种,但其设计的基本原理是相同的。它们大体可以分为两大部分:一是交变电场部分,二是高频直流电击部分。因此,电融合的基本程序也分为两个阶段。

① 细胞膜的接触　当原生质体置于电导率很低的溶液中时,电场通电后,电流即通过原生质体而不是通过溶液,其结果是原生质体在电场作用下极化而产生偶极子,从而使原生质体沿电场线运动,紧密接触排列成串 (图 7.4a)。

② 膜的击穿　原生质体成串排列后,立即给予高频直流脉冲就可以使原生质膜击穿,从而导致两个紧密接触的细胞融合在一起 (图 7.4b)。脉冲次数要适当,次数过多容易造成多个细胞的融合,同时也会造成膜的过度伤害而不能修复。

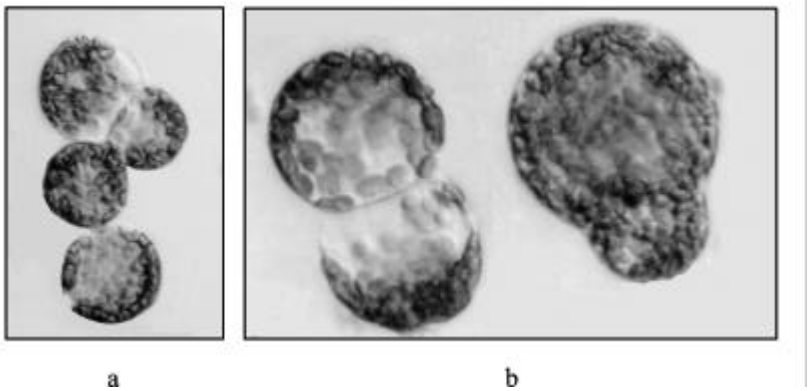


图 7.4　马铃薯 S. tuberosum双单倍体 DH8和野生种 S. chacoense原生质体在交变电场作用下形成串珠 a. 和在高压直流脉冲作用下发生融合　b. (引自蔡兴奎等,2003)

(2) 电融合参数

电融合中融合参数的适当与否对于融合效率及以后的培养都是至关重要的。因为融合仪的不同其融合参数的可调整范围也不同。植物种类的不同,原生质体电融合的参数也不一样。因此,在进行正式融合试验之前,必须对融合参数进行反复测试。电融合中的主要参数有:交流电压、交变电场的振幅频率、交变电场的处理时间、直流高频电压、脉冲宽度和脉冲次数等。如柑橘原生质体融合常采用如下参数:交变电场 125 V/cm,作用时间 60 s;直流脉冲电场 1 250 V/cm,脉冲宽度 40 μs,脉冲间隔 0.5 s,脉冲次数 5次 (刘继红等,2003)。蔡兴奎等 (2003)报道在交变电场 (AC) 100 V/cm、AC作用时间 20 s、直流脉冲电压 (DC) 1 100 V/cm、DC脉冲时间 60 μs及脉冲次数 1次时,马铃薯叶肉原生质体的双核融合率可达 40%以上。

二、原生质体的融合过程

原生质体的融合首先是发生膜的融合。生物膜融合是细胞生物学中重要的现象之一。常态的如内胞饮、外胞饮、质膜桥及其它暂时的胞质联系都发生膜融合。非常态的如物理、化学和生物因素的刺激,可引起细胞病理状态的反应,导致膜融合。膜的融合反应可分为 4个时期:接触、诱导、融合和稳定。膜融合时,质膜上的磷脂状态要发生变化,从而改变质膜的构型和流动性。Ca^{2+}、ATP及三磷酸腺苷酶参与调节了膜的上述变化。

在原生质体膜融合后的数 h内,2个细胞的细胞质混在一起。在双核异核体中,有时两个核同步分裂,但它们的染色体并不受共同的纺锤体控制。如果在此之后接着发生细胞质分裂,就会产生嵌合组织。双核异核体可能在若干个细胞世代中继续产生双核子细胞。核融合可能发生在细胞间期,也可能发生在第一次同步分裂过程中。许多研究证明,只有发生在第一次同步有丝分裂期间的核融合所产生的杂种细胞才可能进一步发育。

三、影响原生质体融合的因素

影响原生质体融合的因素包括从原生质体分离到融合的每一个阶段的各种因素,有的我们已在原生质体培养中讨论过,这里我们仅就涉及到融合的一些主要因素进行论述。

首先,原生质体的质量对细胞融合起着至关重要的作用。高质量的原生质体是细胞融合的首要条件,没有高质量的原生质体,任何融合方法都是无效的。

其次是融合方法。融合方法的选择受到很多试验条件的限制,一般首先选择电融合,如果没有条件进行电融合,就要考虑 PEG融合。

其三是融合参数。影响 PEG融合率的因素主要有 PEG的相对分子质量、纯度、浓度、处理时间、原生质体的生理状况和密度等。影响电融合的因素主要有原生质体的密度,融合液的成分,电极的材料和间距,交变电场强度,直流脉冲的强度、宽幅及次数等。对于不同的植物材料需要经过多次实验,才能找出这些参数的适当值。

第三节 杂种细胞的选择和体细胞杂种的鉴定

一、原生质体的融合产物

两个不同亲本的原生质体混合后经诱导融合,实际上得到的是各种原生质体的混合物,包括异核体 (heterokaryon)、同核体 (homokaryon)以及未发生融合的双亲原生质体。如果是细胞质发生融合而细胞核未融合,两个核处在共同的细胞质中,则形成异核体或异核细胞 (heterokaryocyte)。如果双核异核体的细胞核也发生融合,就会产生真正的杂种细胞。异核体中的两个细胞核,若亲缘关系太远,其中一个核中的染色体会一个个被排除掉,形成不对称杂种 (asymmetric hybrids);如果整个核完全消失,但细胞质依旧是杂合的,这种融合产物叫胞质杂种 (cybrid)。若两个相同原生质体发生融合,则形成同核体 (图 7.5)。

二、杂种细胞的选择系统

两个不同亲本原生质体融合的目的是要获得体细胞杂种，以实现有性杂交所难以做到的基因重组，达到利用远源基因改良性状的目的。因此，需借助一些特殊的方法，有目的地把融合产物中的异核体杂种细胞筛选出来。杂种细胞的筛选是体细胞杂交获得成功的关键技术，经过多年的研究和发展，目前选择杂种细胞的方法主要有以下几种。

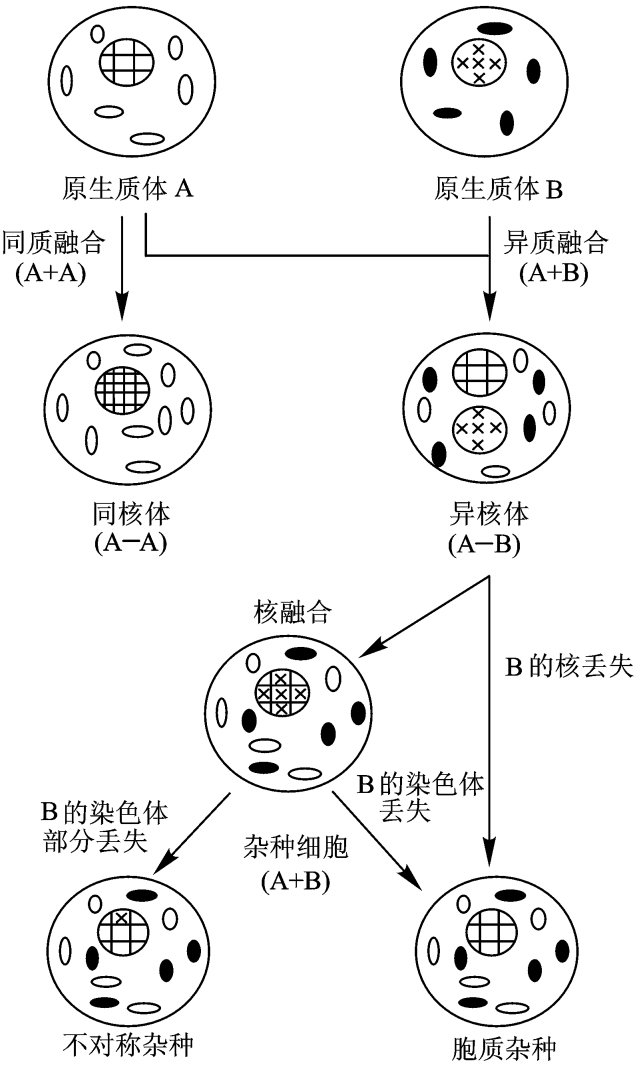


图 7.5　原生质体融合的不同产物示意图

1. 互补选择法

两个具有不同生理或遗传特性的亲本，在形成杂种细胞时能产生互补作用，根据这一特性进行杂种细胞选择的方法称为互补选择法。在特定的培养基上，只有发生互补作用的杂种细胞才能生长，从而能较方便地淘汰非杂种细胞。互补选择法主要有以下几种。

⑴ 激素自养型互补选择

Carlson等（1972）获得的第一个植物体细胞杂种就是采用该方法选择而得到的。在实验中所选用的两个二倍体融合亲本粉蓝烟草（Nicotiana glauca）和郎氏烟草（Nicotiana langsdorffii）的原生质体，其生长需要外源生长激素。融合后形成的双二倍体杂种细胞由于双亲的互补作用，能产生内源生长激素，可以在无外源生长激素的培养基上生长。因此，采用无激素的培养基培养融合产物，只有杂种细胞才能正常生长，而非杂种细胞则很快死亡。这个方法应用的前提是事先必须知道双亲的有性杂种具有这一互补特点，因此具有很大的局限性。

⑵ 叶绿体缺失互补选择

利用叶绿体缺失突变体与野生型互补来选择杂种细胞。Cocking等（1977）曾用该方法来选择矮牵牛体细胞杂种。用一个能在限定的培养基上生长和分化的矮牵牛叶绿体缺失突变体的原生质体与一个在此培养基上只能发育成小细胞团的野生型拟矮牵牛的原生质体进行诱导融合，融合后在限定的培养基上选择绿色的愈伤组织和幼苗，经形态学和细胞学鉴定为体细胞杂种。该方法可以不靠事先有性杂交的知识，能广泛地用于不同亲缘关系的种间融合。另外，在自然界存在不少白化体，还可以通过人工方法诱发产生白化体。用类似的方法在曼陀罗属（Schieder, 1978等）、胡萝卜和羊角芹（Dudits等，1979）、白化的洋金花和颠茄属间融合（Krumbiegel等，1979）等的实验中选择出了体细胞杂种。

⑶ 营养缺陷型互补选择

营养缺陷型互补选择法主要应用于微生物的遗传研究，在高等植物中由于具有营养缺陷型的植物很少，因而只在有限的范围内用来选择杂种细胞。该选择程序比用白化突变体互补选择

法更加有效和严格。Glimelius等（1978）用烟草硝酸还原酶缺失突变体（NR^-）来选择杂种细胞。该硝酸还原酶缺失突变体由于缺乏正常的硝酸还原酶而不能在以硝酸盐作为唯一氮源的培养基上生长，而杂种细胞由于两个突变体的互补作用恢复了正常的硝酸还原酶活性，因此能正常地生长和分化。缺失突变体由缺乏NR脱辅基酶蛋白（nia^-型突变体）和缺乏钼辅因子（cnx^-型突变体）而造成。因此，缺失突变体由于缺乏硝酸还原酶（NR）活性而导致完全需要还原态氮，而nia^-和cnx^-型突变体通过细胞融合可以进行互补（图7.6）。

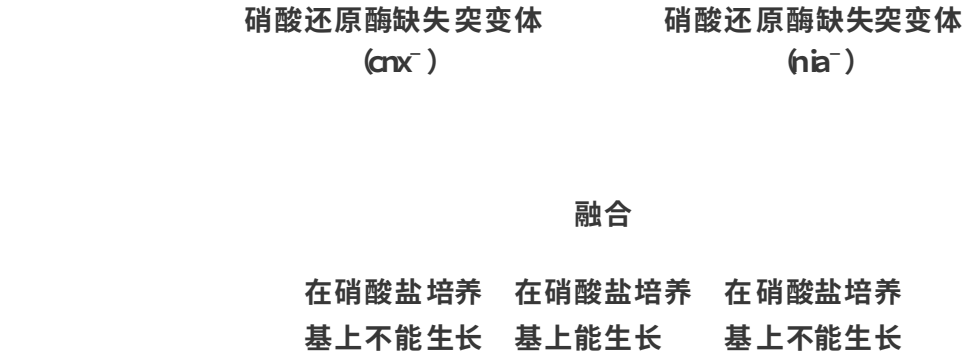


图7.6 营养缺陷型互补选择法示意图

(4) 抗性互补选择

用两个抗性有差异的材料的原生质体进行融合时，每个亲本的药物敏感性分别被对方的抗性所掩盖，因而两个单抗的亲本原生质体融合后可以产生双抗的杂种细胞，然后用相应的选择培养基可将杂种细胞选择出来。Power等（1976）在进行拟矮牵牛和矮牵牛的种间原生质体融合时，采用亲本材料对药物抗性的差异来选择杂种细胞。拟矮牵牛原生质体在限定培养基上只能分裂成几十个细胞的小细胞团，且不受1 mg/L放线菌素D（actinomycin－D）的抑制。而矮牵牛的原生质体在同样浓度放线菌素D的培养基上却不能分裂。经融合后的杂种细胞在含有1 mg/L放线菌素D的培养基上可以形成愈伤组织，并进一步分化形成小植株（图7.7）。

Harms等（1981）用胡萝卜（Daucus carota）分别抗AEC（S－2－aminoethyl cysteine，S－2－氨乙基半胱氨酸）和5MT（5－methyl tryptophan，5－甲基色氨酸）的两个品系的原生质体进行融合，然后在含有AEC和5MT双重抗性物质的培养基上筛选出了杂种细胞。另外，抗卡那霉素、链霉素、氨甲蝶呤、放线菌酮和氯霉素等的突变体也曾用于筛选体细胞杂种。

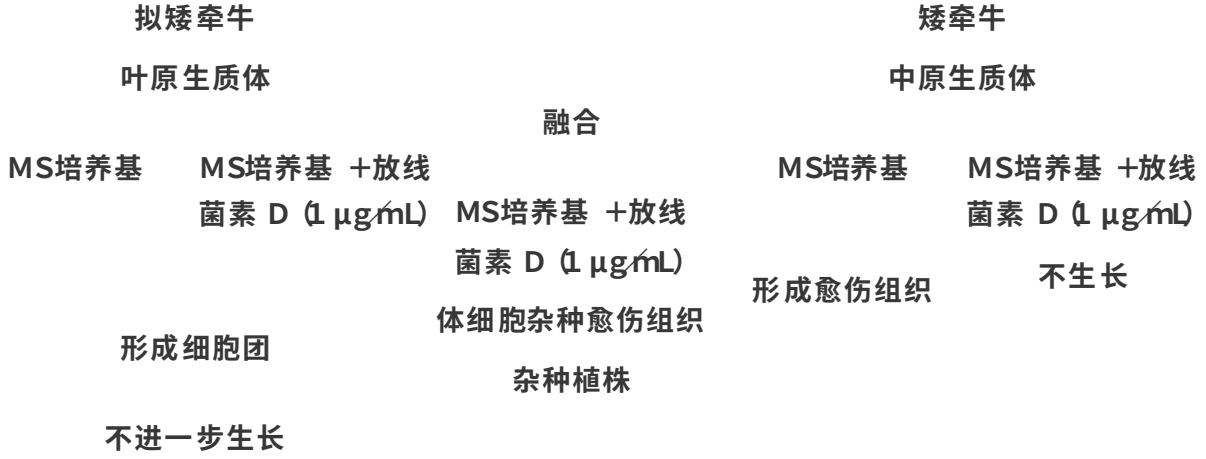


图7.7 基于亲本原生质体对MS培养基和放线菌素D的抗性差异进行杂种细胞筛选示意图

⑸ 抗光性互补选择

Melchers等（1974）将两个烟草缺叶绿素光敏感品种 S（Sublethal）和 V（Virescent）花药培养产生的单倍体的叶肉原生质体进行融合，根据抗光性来选择杂种植株。这两个突变体是由非等位隐性基因控制，在正常光照下生长缓慢，叶色淡绿，但有性杂交的 F_1 杂种则能正常生长。经过原生质体融合后形成的具有两个隐性基因的双杂合子杂种，经抗光性互补在光照下培养能产生正常叶色，并对高光强有抗性。

互补选择法一般都要求有相应的突变体。在体细胞杂交的研究中，虽然人们已经建立和利用了各种各样的突变体，但是在植物中要建立突变细胞系比较困难，如果要使突变细胞系保持再生能力就更难了。因此，在植物中目前还不像在微生物中那样有各种突变体可供利用，从而使互补选择法在实际应用时受到了很大的限制。

2. 机械选择法

利用两种原生质体的某些可见标志，如形态色泽上的差异等对融合产物进行鉴别，在其可辨特征消失之前，将融合的细胞从混合群体中挑选出来进行单独培养，这一方法称为机械选择法。

⑴ 利用天然颜色标记分离杂种细胞

Kao（1977）将大豆根尖悬浮培养细胞的具有浓厚细胞质的非绿色原生质体与粉蓝烟草叶肉细胞的绿色、液胞化的原生质体进行融合，异核体容易与亲本区别。异核体既具有粉蓝烟草原生质体特有的绿色质体，又具有与大豆原生质体相似的形态和丰富的细胞质带。在融合后的几个 h内，粉蓝烟草的原生质体仍然是球形，而且细胞质带非常少。用微吸管将异核体吸取出来，转移到 Cuprak培养皿中进行培养，待异核体长成细胞团后再做进一步的鉴定。采用同样的方法，Gleba等（1979）选择出了拟南芥（Arabidopsis thaliana）和芸苔（Brassica campestris）的体细胞杂种，其方法是把拟南芥培养细胞的原生质体和芸苔叶肉的原生质体进行融合，杂种细胞在颜色上与亲本具有较明显的差异。培养 3～5 d后，用微吸管从培养物中将单个的融合产物吸取出来，分别置于 Cuprak培养皿中进行培养。其亲本原生质体在最初所用的培养基上不能正常生长，这就相当于又加入了选择压。Menzel等（1981）通过类似的方法获得了普通烟草和金氏烟草（Nicotiana knightiana）的体细胞杂种植株。

⑵ 利用荧光素标记分离杂种细胞

对于在形态上彼此无法区分的原生质体融合形成的异核体，可利用非毒性的荧光素标记亲本原生质体来选择杂种细胞。荧光素标记选择杂种细胞的原理是：先用两种不同的荧光染料分别标记两亲本的原生质体群体，然后进行诱导融合，在荧光显微镜下根据两种染料的存在，可以把异核体与双亲和同核体区分开来。利用该方法可以鉴别两个叶肉原生质体或两个细胞培养物的原生质体融合后形成的异核体。Galbraith等（1980）用异硫氰酸荧光素（发绿色荧光）和碱性蕊香红荧光素（发红色荧光）分别标记了两种烟草的叶肉原生质体，有效地选择出了杂种细胞。

利用天然颜色标记和双重荧光标记机械挑选杂种细胞已取得了一定的成效，但显微操作费工费时，选择出异核体的量很少，而且获得的杂种细胞必须进行单细胞培养，所用实验材料的原生质体必须具有单细胞培养再生植株的能力，因此，这种方法具有一定的局限性，要获得大量的杂种植株比较困难。

⑶ 应用荧光激活细胞分选仪自动分离杂种细胞

应用荧光激活细胞分选仪（fluorescence activated cell sorter, FACS）可以自动分离融合产物，

用两种不同的荧光素分别标记双亲的原生质体,经融合处理后,异核体应同时含有两种荧光素。当混合细胞群体通过细胞分类器时,产生的微滴中只含有单个原生质体或融合体,用电子扫描确定微滴的荧光特征并作自动分类,得到 3个不同的分类产物。因此,可将含有两种颜色的杂种细胞分离出来。这种技术不但准确,而且效率极高,大约每秒钟可分离 5×10^3 个细胞,是一种非常有前途的方法,但由于仪器比较昂贵,目前采用的人还不多。

3. 组织培养筛选法

植物细胞对培养基成分和培养条件的要求与反应不同也可作为选择杂种细胞的依据。可以利用这种特性或人为地造成杂种细胞生长和分化能力的差异进行杂种细胞的选择。近年来有不少研究者 (Waara等,1992;Matthei等,1992)发现,融合细胞与未融合细胞对组织培养的反应不同,主张用组织培养筛选法结合形态学观察去鉴别和筛选杂种。另外,Uijtewaal等 (1987)用 8个马铃薯单倍体品系进行融合时还发现,自体融合的细胞生活力弱,分化比异核体落后。这一现象为利用培养基和培养条件筛选异质融合的细胞和杂种植株提供了极为有利的条件,能够进行大量筛选。

原生质体再生愈伤组织的形态和颜色也可作为杂种选择的依据。孙勇如等 (1982)将粉蓝烟草和矮牵牛的原生质体融合,培养后得到了 3种类型的愈伤组织,即白色松软的愈伤组织,与粉蓝烟草的一致;深绿致密的扁平状愈伤组织,与矮牵牛的一致;还有一类明显介于两者之间的中间类型。由中间类型愈伤组织再生的植株,后来检测证明是体细胞杂种 (李文彬等,1983)。

细胞在培养基上的生长差异还可以人为地产生。用不同的生化抑制剂分别处理不同亲本的原生质体,阻塞其代谢机能,使它们不能在培养基上生长,而融合后产生的杂种细胞由于重建了必要的代谢支路,能在培养基上正常生长。Bottcher等 (1989)用碘乙酸酯和罗丹明 6G分别处理两类烟草原生质体,碘乙酸酯处理能使细胞核失活,而罗丹明 6G能抑制线粒体中葡萄糖的氧化磷酸化过程。用这两类物质处理的原生质体在培养基中都不能分裂,而只有融合后产生的杂种细胞才能在培养基上正常生长,并进一步获得了杂种植株。

总而言之,在植物原生质体融合的研究中,目前还没有一种通用的方法用于所有杂种细胞的筛选。在进行原生质体融合的实验中,可根据所研究的物种及材料的具体情况,选用其中的 1种方法或综合应用这些方法来选择杂种细胞。

三、杂种植株的鉴定

杂种细胞的筛选仅能为体细胞杂种的真实性提供间接的证据。受多方面因素的影响,亲本细胞有可能滑过选择关,初始融合产物的遗传物质也有可能被排除。另外,培养过程中还有可能发生体细胞无性系变异等。因此,必须对获得的杂种植株进行严格的鉴定。杂种植株的鉴定可从形态学、细胞学、遗传学、生化及分子生物学等方面进行,为确定真正的体细胞杂种提供强有力的证据。

1. 形态学鉴定

植物的形态特征可为杂种的鉴别提供依据。与有性杂交一样,形态学是最基本的鉴定方法。叶片的大小、形状,花的颜色、花形,株高、株形、叶脉和花梗,表皮毛状体类型,花粉粒的大小和形状,种子的有无及其大小、形状和颜色等均可作为鉴定的指标。体细胞杂种植株应具有两个亲本的形态学特征,或属于双亲的中间类型,或与亲本有所区别。但是这些特征一般是由多基因控制

的性状,体细胞杂种的形态变异难以与非整倍体或离体培养条件下产生的体细胞无性系变异明确地区别开来,所以只有形态学的鉴定是不够充分的。Carlson等(1972)获得的第一个粉蓝烟草和郎氏烟草的体细胞杂种植株,其叶的形态学和有性杂种相同,而和任何一个亲本类型都有区别。郎氏烟草的叶片是无柄的,并为密毛所覆盖;粉蓝烟草的叶片是有柄的,而且光滑无毛。杂种的叶是中间形态,在叶片上有毛,但毛的密度低得多。Austin等(1985)获得的马铃薯两个双单倍体品系间的杂种植株,其茎色、花色呈现双亲中间类型,叶色、花药颜色及薯块皮色表现为双亲性状的加强,而叶片的厚度同亲本之一,叶缘形状则趋于另一亲本。疣粒野生稻(Oryza meyeriana)和栽培稻的原生质体融合研究中也观察到,疣粒野生稻的平均茎叶夹角为 80°,栽培稻亲本的平均茎叶夹角为 35°,杂种植株的平均茎叶夹角为 55°,处于中间状态。同时,扫描电子显微镜观察的结果显示,疣粒野生稻的花药表面纹饰较为稀疏,栽培稻的较为密集,而杂种则趋于中间类型。Mattheij等(1992)发现,杂种细胞形成的愈伤组织为紫色,而未融合的原生质体则形成了绿色的愈伤组织,从而建议体细胞杂种在愈伤组织形成阶段的颜色、质地以及是否存在杂种生长优势也可作为形态学指标加以应用。

2. 细胞学鉴定

染色体的数目和形态具有种的特征,是鉴别杂种的主要细胞学依据和必不可少的指标。对于一些近缘物种,由于染色体形态差异不大,很难对杂种作出准确判断,需进一步借助染色体分带技术和核型分析使之更加精确化。一般在融合时多采用二倍体原生质体,因此将会得到四倍体杂种植株,也有非整倍体的出现。大部分种内或种间体细胞杂种的染色体数目大体上没有偏离双亲染色体数目的总和。除双二倍体外,多为异源非整倍体,也有多核融合形成的异源多倍体。不亲和的属间体细胞杂种植株的染色体却有较大的偏离,而且杂种细胞的染色体还会不断地发生丢失,这种偏离可能和两者的不亲和性有关。在马铃薯原生质体融合中,大多数采用双单倍体品系或二倍体野生种作为供体材料,获得的杂种植株大部分为四倍体,同时也可获得六倍体和八倍体,并且还有可能产生非整倍体。另外,一些研究者还应用了染色体 C分带技术来鉴定体细胞杂种。植株叶片保卫细胞叶绿体的数目也可作为杂种倍性鉴定的参考(Mattheij等,1992;司怀军等,1998)。

3. 生化分析

在体细胞杂种鉴定中应用最普遍的生化方法是同工酶分析。体细胞杂种的同工酶谱可表现为双亲酶带的总和,或同时出现双亲特有的谱带,或者也有可能出现新的杂种带和丢失部分亲本带。Carlson等(1972)报道了体细胞杂种叶片的过氧化物同工酶与有性杂种相一致,是两亲本中所出现的总和。Wetter等(1976)的研究结果表明,愈伤组织培养物的酶谱能用于鉴定有性杂种和体细胞杂种。将乳酸脱氢酶和酒精脱氢酶结合使用,可以准确地鉴定出粉蓝烟草和郎氏烟草的体细胞杂种和有性杂种。Wetter(1977)还研究了大豆和烟草体细胞杂种细胞株的同工酶模式,有 5个不同的大豆和烟草体细胞杂种细胞株的酒精脱氢酶和天冬氨酸氨基转移酶的酶谱显示了来自两个亲本的酶学特征。在 8个月的培养期中,观察到大豆或烟草亲本株中同工酶的分布没有变化。而杂种细胞株的酶谱发生了变化。这些变化可能与杂种中染色体的缺失有关,特别是与烟草亲本的染色体缺失有关。Waara等(1988)还曾研究了 14种同工酶在马铃薯体细胞杂种中的表现,结果显示磷酸葡萄糖变位酶、磷酸葡萄糖异构酶、苹果酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶和酯酶能很好地用于识别马铃薯种内体细胞杂种。另外,Barsby等

(1984)用等电聚焦技术分析了由核基因编码的叶绿体组分Ⅰ蛋白 (1,5-二磷酸核酮糖羧化酶,RuBpcase)的小亚基多肽图谱,结果在获得的体细胞杂种中含有双亲的谱带。Imai等 (1992)还用双向蛋白质电泳法鉴别马铃薯体细胞杂种也取得了较为满意的结果。

4. 分子生物学方法

近年来发展起来的分子生物学技术能够为体细胞杂种的鉴定提供直接的证据,而且还能检测出杂种含有多少亲本的基因组成分以及可将基因定位于某个染色体上,并鉴别出异常染色体,从而使体细胞杂种的鉴定工作更为精确化。Southern印迹杂交法和分子标记技术如 DNA 限制性片段长度多态性 (RFLP)、RAPD、AFLP和微卫星 DNA 等也开始用于体细胞杂种的鉴定,并取得了良好的效果 图 7.8)。另外,对体细胞杂种与其融合亲本的细胞器 DNA进行比较分析,可以判定融合产物中的叶绿体或线粒体是否与融合亲本的一方或双方相同,或者是新的一种。用克隆的叶绿体 DNA (cpDNA)或线粒体 DNA (mtDNA)片段对酶解的总 DNA进行 Southern杂交,是一种鉴定体细胞杂种细胞器基因组的较好方法,只需要少量的植物材料就可以确定杂种细胞质中不同亲本细胞器 DNA的重组。但要注意的是,不同的细胞器 DNA之间可能会有一定的同源性,有时会产生非特异的信号。

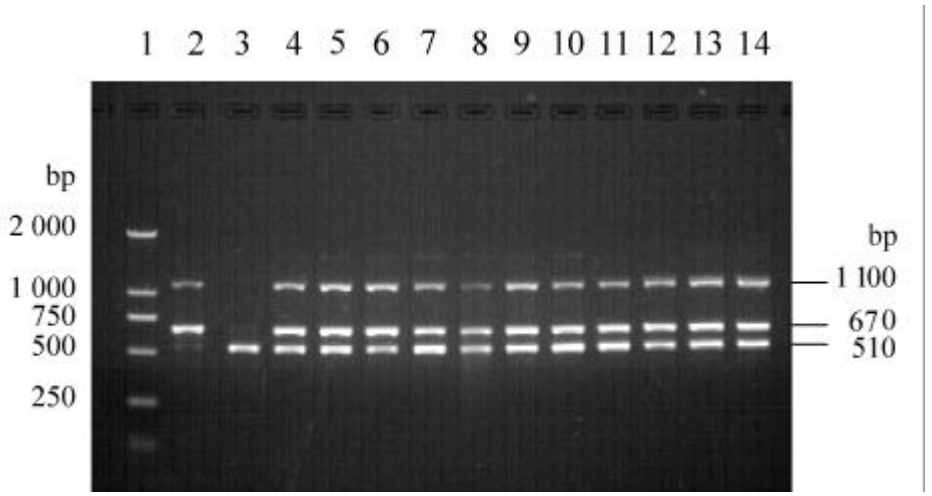


图 7.8 体细胞杂种及其亲本的 RAPD谱带 (引物 C-01)
1:Marker DL 2000;2 双单倍体亲本 (DH 8);3:野生种亲本 S. chacoense;4~14:体细胞杂种株系
(引自蔡兴奎等,2003)

GISH (基因组原位杂交)技术也已开始应用于鉴定植物体细胞杂种,用 GISH可以通过可见的方法把细胞核内分子组成上有差异的基因组区别开来。GISH在植物中的早期应用主要是鉴定属间或其它远缘杂种,后来也更多地用于区分近缘物种的 DNA。用 GISH可以确定杂种的细胞遗传学成分和减数分裂时各自基因组成员的命运,还能鉴定有性杂种和体细胞杂种中的附加系、代换系和异位系。

四、体细胞杂种的遗传特性

1. 细胞分裂与染色体丢失

如前所述,如果细胞分裂而核不发生融合,在以后的发育过程中就会有两种结果:一是细胞分裂几次以后即停止生长从而导致死亡;二是在发育过程中某一亲本的细胞核部分或全部丢失。如果这样就会产生几种情况:A细胞 +B细胞质;A细胞 +B细胞质和部分染色体或基因。

在多数的体细胞杂交实例中,杂种的染色体数目在一定范围内变化。即使是对等的细胞融合,得到的杂种恰好是双二倍体的情况也较少。有的情况下,膜融合后形成双核异核体,双核可能受不同纺锤体控制,可以传给子代。核融合可以发生在细胞间期,也可以发生在有丝分裂期间。但一般认为,间期发生核融合的杂种是没有活性的,只有在有丝分裂期间发生核融合的杂种才能继续发育。同时,在有活力的杂种中,异源的染色体组常常不能完全结合在一起,出现染色体消减和染色体异常情况。染色体消减主要是由于不同的纺锤体的形成和作用不同步引起的。染色体异常现象包括环状染色体、长染色体、多缢痕染色体、染色体片段和染色体桥等,它们多是由于不正常配对造成的。同样,在体细胞杂种的胞质内含物的分离行为上也观察到了一方胞质内含物的消减现象。

2. 基因转移与性状表达

由于染色体的部分丢失,常常使某个亲本的部分或个别基因与另一亲本的染色体发生整合,其结果是实现了亲本间的基因转移。基因转移通常表现为后代中某些性状得以表达,有时由于基因的重组也可能产生双亲均没有的新性状。

细胞融合得到的杂种往往是一个复杂的群体,由于融入了父母本双方的特性,性状分离可能相当严重,作为育种材料来讲,其稳定过程可能需要相当长的时间。作为育种考虑的农艺性状可能会较差,特别是会出现严重的不育性状。

3. 体细胞杂种在遗传上的不稳定性

体细胞杂种后代在遗传上常常不稳定,这可能涉及到多方面的因素,如亲缘关系的远近,培养过程中的染色体变异以及细胞核和/或细胞质遗传物质的重组等。

第四节　细胞质杂种

一、细胞质杂种概念

通过原生质体诱导融合所得到的细胞杂种,按照融合产物的细胞核组分可分为两类,即对称杂种(symmetric hybrids)和不对称杂种(asymmetric hybrids)。对称杂种含有双亲的全部染色体组成。在亲缘关系比较近的一些近缘而亲和的物种之间的原生质体融合,一般得到的是对称的细胞杂种。不对称杂种常常有一个融合亲本的染色体组成发生部分或单向丢失。在亲缘关系较远的一些物种之间的原生质体融合获得的杂种细胞,在离体培养或继代选育中,常常发生某一亲本的染色体部分或全部丢失,最后形成不对称的细胞杂种。如果得到的杂种只含有亲本一方的核基因组,而含有亲本双方的细胞质基因(叶绿体和线粒体基因),这样的细胞杂种称为细胞质杂种或胞质杂种(cybrid)。

胞质杂种提供了细胞核以外遗传物质异源性融合的机会,与一般的细胞杂种不同,胞质杂种只具有一个亲本的核基因组,但具有双亲的细胞质。在胞质细胞器中的叶绿体 DNA(ctDNA)和线粒体 DNA(mtDNA)等遗传物质可以控制雄性不育性状的表达,影响光合作用的结构与功能,叶绿素缺陷型的形成,与碳代谢有关酶类的合成与功能以及对某些抗生素的抗性等。因此,胞质杂种的研究具有重要的理论和实践意义。

二、细胞质杂种产生的途径

胞质杂种可以通过以下几种途径产生：一个正常的原生质体与一个去核的原生质体融合；一个正常的原生质体与一个核失活的原生质体融合；用原生质体与亚原生质体或微原生质体融合；在杂种细胞的增殖过程中一个亲本的染色体丢失；用抑制剂处理得到胞质杂种等。

Power等（1975）证实，经过原生质体融合和培养，有可能分离出一种细胞系，其中带有一个亲本的核和两个亲本的细胞质。他们将矮牵牛的叶肉原生质体与爬山虎的冠瘿瘤培养细胞的原生质体融合，选出了一个细胞系，其中只含有爬山虎的染色体，但在一定时间内表现出某些矮牵牛的特性。用一些物理或化学的方法如 X 射线、γ 射线、碘乙酰胺（IOA）和罗丹明 6G（R6G）等处理供体原生质体使细胞核失活，再与未经处理的一个亲本的原生质体进行融合，将有可能得到胞质杂种。烟草对链霉素的抗性是由叶绿体 DNA 控制的。Medgyesy等（1980）用碘乙酸处理抗链霉素烟草的原生质体，使其失去分裂能力，然后与对链霉素敏感的林生烟草的正常原生质体融合，从而将抗链霉素的特性转移到了林生烟草。Lorz等（1981）将原生质体在一个由 5%～50% Percoll制成的等渗密度梯度中进行高速离心（20 000～40 000 g，40～90 min），一步即可得到高度纯化的去核原生质体，即胞质体（cytoplasts）。利用细胞质供体细胞的去核原生质体与受体亲本的完整原生质体进行融合，就完全不必再用一个选择系统以抑制其中一个亲本的生长，即可得到胞质杂种。

第五节 原生质体的遗传饰变

分离的原生质体由于没有细胞壁的障碍，可以进行许多遗传操作的研究。原生质体作为遗传物质的一种受体，不仅可以摄取 DNA、染色体和质粒等核酸大分子，而且还可以通过吞噬或融合作用来摄取细胞器和细菌、病毒等微生物，从而为利用原生质体进行细胞遗传物质的饰变提供了有利条件。摄取了外源遗传物质的原生质体，其遗传结构和功能有可能发生相应的改变，经培养再生的植株会出现一些新的性状，从而为植物优良性状的导入和遗传改良提供了基础。

一、细胞核移植

用原生质体摄取分离的细胞核是转移核基因组的一条可行途径。摄取细胞核后，在一个未经修饰的细胞质背景下将会有两个核基因组。进行核移植时，首先要得到大量较纯而有活力的细胞核。

1. 细胞核的分离

分离植物细胞核时，主要存在细胞壁的障碍。同时，大量的叶绿体、淀粉粒和核酸酶等的存在，将影响核的释放、核制备物的纯度和遗传操作的可靠性。分离细胞核的质量主要在于核的完整性、纯度和生活力。近年来，经不断改进分离方法，已能得到较纯而有活力的核制备物，并已成功地用于核移植试验。目前，分离细胞核的方法主要有匀浆法和从原生质体中分离两种方法。

匀浆法是直接从植物组织中分离细胞核。将要分离的材料置于组织捣碎机中进行匀浆，加入去污剂 Triton X－100以溶解细胞膜及除去其它细胞质组分，从而释放出细胞核，然后经过滤

离心,即可得到较为纯净的细胞核。分离过程必须快速并在低温下进行,在分离和保存缓冲液中加入适量的镁离子和甘油有利于核膜的完整性。

从原生质体中分离细胞核时,首先要制备大量的原生质体,然后将原生质体在低渗分离缓冲液中经适当温和的机械力处理可使其裂解,再采用分步过滤和离心的方法可得到较纯净的细胞核。Lorz等(1978)将原生质体放在低渗缓冲液中,加去污剂 Triton X－100处理,可使质膜破裂,经梯度离心,可将细胞核与其它细胞成分分开。为了提高分离核的产率,Saxena等在 1985年用了较为复杂的分离缓冲液和低浓度的 Triton X－100(0.01%～0.02%),在 pH为 5.2的条件下,使多种植物分离细胞核的产率达到了 80%以上。

2. 细胞核的移植

细胞核和细胞器移植的方法主要有夹层离心法和 PEG等融合剂诱导法。此外,用脂质体包裹细胞器然后再使其摄入,可起保护细胞器的作用。电场诱导和微注射等方法对细胞器(核)的移植也具有很大的潜力。

夹层离心法(alternating－layer centrifugation)是最早用于摄入细胞核和细胞器的方法。将分离的原生质体低速离心沉于离心管管底,用同样的方法将细胞核或细胞器铺于原生质体层上面离心,如此重复多次。最有利于细胞器摄入的条件是,细胞器的缓冲液与原生质体培养基相比是低渗的并含有 0.03%溶菌酶。由于重复离心,溶菌酶的作用和质壁分离以及质壁分离复原条件的多次反复,使原生质体和分离的细胞器都受到很大压力,导致细胞器或细胞核的摄入。Potrykus等(1973)采用夹层离心技术将矮牵牛的细胞核导入到矮牵牛、粉蓝烟草和玉米的原生质体中,摄取核的频率为 0.5%。

Binding(1976)用 PEG和硝酸钙诱导矮牵牛的核转移,但在受体烟草原生质体分裂时未看到外源染色体的出现。Lorz等(1978)用 PEG诱导融合的方法,将几种禾谷类植物的核导入玉米原生质体中,摄入率可达 5%,但未能证明外源核基因在受体细胞中的转录与表达。Saxena等(1986)提供了核移植试验成功的可靠证据,用 PEG和 Ca^{2+}诱导将一种蚕豆(Vicia hajastana)分离的核导入到毛曼陀罗(Datura innoxia)泛酸营养缺陷型细胞的原生质体中。先培养在非选择性培养基上,促使细胞启动分裂,经 4～5 d后用无泛酸的培养基稀释培养。经培养一段时期后转移到无泛酸的选择性培养基上进行培养,使摄取了外源核的原生质体形成了愈伤组织,并得到再生小植株。DNA印迹杂交证明,在毛曼陀罗原养型细胞中存在供体核的 DNA。Saxena等(1987)还用甘氨酸－PEG－$CaCl_2$溶液诱导研究了摄取的最适条件,发现影响核转移的因素有 PEG的种类和浓度、诱导溶液的 pH和保温时间。选用相对分子质量为 4 000、浓度为 20%～30%的 PEG,在 pH为 6～7的条件下,核摄取率最高,可达 4%～6%。另外,还发现二甲基亚砜可以提高核摄取率。采用这一程序,他们将黑芥(Brassica nigr)、大豆、Vicia hajastana和毛曼陀罗的分离核成功地转移到毛曼陀罗两个营养缺陷型细胞系的原生质体中。这些试验表明,核移植是植物基因转移、整合和表达的一种有效途径。

二、叶绿体移植

通过原生质体融合产生的杂种细胞中,一般不仅含有双亲的核组分,同时还含有双亲的细胞质组分。叶绿体移植具有重要的意义,它有助于更精确地研究细胞器遗传学和种间细胞器互作,有助于进一步弄清叶绿体的发育生物学以及核和叶绿体 DNA如何控制叶绿体的发生。在应用

研究方面,有可能用于植物光合作用效率的改良。但迄今在该领域内所取得的进展还只是探索性的。

1. 叶绿体的分离

分离叶绿体主要有机械研磨分离法和从原生质体中分离叶绿体两种方法。用机械研磨和离心技术从植物材料中分离的叶绿体,主要用于生理学和生物化学方面的研究,也用于叶绿体摄取的研究。该方法在菠菜、豌豆等 C_3 植物中应用较多。用此法分离叶绿体省时经济,还可避免原生质体分离的酶液中所存在的某些抑制剂的影响。但是,用这种方法所分离的叶绿体其完整性和生物活性均较从原生质体中分离的叶绿体低。

用机械法分离叶绿体时,材料的选择十分重要,一般要求是质地较软而易于匀浆的材料。大多数单子叶植物很难用机械法分离叶绿体,有些情况下,利用单子叶植物的幼苗进行分离比用其它材料的效果要好。分离叶绿体时,一般不宜采用含有较高酚和鞣酸类物质以及蛋白酶等降解酶活性较高的组织。另外,含有大的淀粉粒的叶绿体在离心时容易破裂,因此最好用淀粉含量低的材料分离叶绿体。叶片材料取材前预先光照 20～30 min,可提高分离率。取材后先除去大的叶脉,将叶片剪碎,放入预冷的研钵中,加入少量石英砂和分离缓冲液 (0.4 mol/L 蔗糖,0.05 mol/L HEPES,0.01 mol/L NaCl,pH 7.6),迅速磨成匀浆,然后用纱布过滤,收集滤液于离心管中进行离心,叶绿体将沉淀于管底。

从原生质体中分离叶绿体时,可采用幼嫩叶片或细胞悬浮培养物。根据所用植物材料,按前面章节介绍的原生质体分离技术进行原生质体的分离和纯化,然后将纯化的原生质体悬浮于裂解液中 (0.3 mol/L 山梨醇,25 mmol/L HEPES－KOH,10 mmol/L EDTA,pH 7.5),使质膜破裂,释放在溶液中的叶绿体可通过低速离心收集。

用这两种方法收集的叶绿体中常混有其它的一些细胞器如线粒体、过氧化物酶体以及细胞核等,可用 Percoll或蔗糖密度梯度离心法进行纯化。

2. 叶绿体的移植

由于叶绿体中具有可见色素,因此,叶绿体常作为细胞器移植研究的材料。叶绿体移植时,一般选用白化突变体或无叶绿素的培养细胞的原生质体为受体,以野生型叶绿体作为供体。Carlson (1973) 将烟草野生型植株的叶绿体与白化突变体烟草的原生质体共培养得到再生的花斑绿色植株,从而认为叶绿体在受体细胞质中进行了正常的复制并行使了生物学功能。作为 Carlson工作的延续,Kung等 (1975) 在含有 1 μg/ml聚 －L－鸟氨酸 (MW 20 000) 的培养基中,以 Nicotiana suaaveolens的叶绿体处理一个花斑烟草品系的白化原生质体,培养获得了再生植株。对再生植株叶绿体组分Ⅰ蛋白质所做的分析表明,再生植株具有两种烟草的 RuBpcase的大亚基,说明再生植株含有两种烟草的叶绿体 DNA。在再生植株叶提取物中也发现了两种烟草的 RuBpcase小亚基多肽,这也表明发生了核的转移。Potrykus (1973) 采用夹层离心技术将正常矮牵牛的叶绿体转移到白化突变体的叶原生质体中,发现在 0.1% ～0.5%原生质体中有 1～20个正常叶绿体,6 d后在光镜下仍然可见转移的叶绿体,但未培养成功。Bonnet等 (1974) 采用 PEG 诱导融合的方法将双叉无隔藻 (Vaucheria dichotoma) 的叶绿体导入胡萝卜原生质体,在 16%的成活原生质体中含有 1至多个外源叶绿体。另外,Bonnet等 (1977) 采用类似的方法将刺松藻 (Codium fragile) 的叶绿体转移到胡萝卜白化的原生质体中,其中有 45%的原生质体含有外源叶绿体。用 PEG法将菠菜叶绿体导入粗糙脉孢菌 (Neurospora crassa) 原生质体、矮牵牛叶绿体导入爬山虎 (Parthenocissus tricuspidata) 原生质体

(Davey等,1976),以及胡萝卜原生质体摄取玉米叶绿体 (马诚等,1981)的实验都实现了叶绿体的移植,但均未能提供叶绿体基因在受体细胞中整合与表达的证据。为了避免 PEG处理产生有害的影响,Giles (1980)将叶绿体包裹在脂质体中,然后与原生质体融合,约有 85%的毛曼陀罗原生质体摄取了菠菜的叶绿体,从而提高了叶绿体的摄取率。

对叶绿体摄入过程的电镜研究表明,PEG能引起叶绿体两层外膜的融合。在被摄入原生质体的过程中,两层融合了的外膜又与原生质体的质膜融合,于是引起叶绿体的破坏。因此,这些叶绿体在进入细胞后极少具有生物学功能。目前所做的叶绿体实验几乎均以充分发育的叶绿体为供体,也许充分发育的叶绿体不是一种细胞器移植的理想材料,今后应更多地注意以未分化的前质体为供体,可能更容易适应受体细胞内的新环境 (Lorz, 1985)。

三、染色体的摄取

在高等植物的遗传操作中,染色体的分离和摄取具有重要的意义。有了完整而具活性的染色体,可以将其转移到原生质体中,通过进行培养使其再生植株,从而有可能获得异缘物种的遗传性状。另外,可以用分离的中期染色体制备大分子 DNA,为分离特定基因、建立基因文库和研究中期染色体的分子生物学提供实验系统。

1. 染色体的分离

常采用从培养细胞制备的原生质体来大量地分离植物染色体。先进行细胞培养及细胞分裂同步化处理,以便得到较多的有丝分裂相。培养细胞的同步化常应用羟基脲和秋水仙素处理的方法而达到。然后从中期分裂相较多的培养细胞中分离出原生质体,再经低渗缓冲液处理使染色体释放。将含有染色体、核和细胞碎片的缓冲液先用低速离心 (200 g, 10 min),此时染色体仍悬浮在缓冲液中,沉淀的是核及细胞碎片。取上清液,用 1 000 g离心 20 min,收集纯的染色体。用此种方法分离出的染色体从形态和生化组成上均能保持完整性。

2. 染色体的摄取

原生质体摄取分离的染色体是核基因组转移的比较精细的方法。其摄取程序起初是模仿 PEG诱导细胞融合的方法,将原生质体与染色体相混合培养并加入诱导剂,可促使原生质体摄取染色体。Szabados等 (1981)将外源染色体转移到一粒小麦、玉米和欧芹的原生质体中,得到 10^{-5}～10^{-4}的摄取率。Griesbach等 (1982)将百合根尖分离到的染色体与烟草叶肉原生质体混合培养,并加入 35% PEG继续培养 20 min,发现有 1%的烟草原生质体吸收了异源染色体。为了鉴定出异源染色体进入受体,他们先将染色体用荧光染料 4,6－二脒基－2－苯基吲哚 (DAPI)染色,该染料能与 DNA结合并发出黄绿色的荧光,而与叶绿体结合则发出暗红色荧光。实验发现,部分原生质体的暗红色叶绿体间有黄绿色的百合染色体。轻轻敲打盖玻片使原生质体转动,证明异源染色体并非在原生质体的外表,确实是进入了其内部。用 PEG法导入外源染色体的实验目前仍未能使受体细胞培养成功,可能是分离的染色体经受不住 PEG的毒害。

后来,人们采用的显微注射法 (microinjection)有助于这一问题的解决。Griesbach (1987)将碧冬茄原生质体在 Percoll中进行梯度离心处理,使其去掉液胞,然后注入异源染色体。结果接受外源染色体的原生质体成活率达到 23%,比未去液胞的受体细胞成活率提高了两倍。进一步培养获得了杂种愈伤组织,其蛋白质电泳图谱与对照相比存在明显的差异,再生植株花的类黄酮标志也与亲本不同,表明有新的性状传递到了后代。De Laat等 (1987)将被注射的原生质体预先

固定在琼脂糖凝胶的表面,然后再进行注射,使白花丹叶烟草(Nicotiana plumbaginifolia)的染色体转入同种植物的原生质体中,得到了较高的成活率。这些研究成果为高等植物染色体介导的遗传转化提供了一种新的途径。但是对于异源染色体摄取后的命运,以及转化体获得的新性状能否稳定遗传等尚需进一步深入研究。

四、外源 DNA 的摄取

通过把 DNA 导入细胞而进行高等植物的遗传转化是一个高度复杂的过程,涉及到外源 DNA 的摄入和在受体细胞的异种环境中的整合、复制、表达和传递等一系列活动。导入离体 DNA 而进行植物遗传饰变的早期研究,是以整体植物系统如种子或幼苗来进行的。后来,由于原生质体培养取得了重大突破,再加上原生质体的单细胞特点,如同细菌一样能与周围环境中的 DNA 均匀接触,从而逐渐被重视起来。

在高等植物中,Ohyama等在 20世纪 70年代初最先利用原生质体进行了以 DNA 为媒介的遗传转化。此后又有若干作者用细菌 DNA在高等植物中进行了类似的实验,发现 DEAE-葡萄糖、聚-L-赖氨酸和聚-L-鸟氨酸等多聚离子的存在能够促进 DNA 的摄入。另外,Suzuki等(1976)还发现,Zn^{2+}能促进烟草原生质体对噬菌体 DNA 的摄入。但是,作为活细胞的原生质体也具有阻止外源 DNA 进入的防卫系统。外源 DNA 可能结合到原生质体膜上,或者被细胞外核酸酶降解。另外,进入原生质体后的 DNA 在进入核之前,也会遭到细胞质核酸酶的攻击,最后可能只能有一部分 DNA 能够进入细胞核。于是,人们又提出通过外源 DNA 导入原生质体进行植物遗传转化的另一途径,即在离体条件下将 DNA 片段与作为分子载体的质粒或病毒 DNA 重组,然后再导入原生质体中,这样有可能降低核酸酶的降解作用。目前,以原生质体为受体系统的农杆菌与原生质体共培养法、PEG 介导的基因直接转移法、电穿孔法、显微注射法、基因枪法和超声波法等均已在高等植物的遗传操作中取得了显著的成就。

五、微生物移植

分离的高等植物原生质体可以通过内吞作用摄取菌类和藻类细胞等。Giles等在 1975至 1978年期间,开展了该领域的探索性研究,他们用 PEG 法使棕色固氮菌(Azotobacter vinlandii)进入真菌毛霉属(Rhizopogon rubescens)原生质体后,这种诱导的原生质体与裸子植物辐针松的根形成了菌根的联合。与此同时,Davey等(1975)将酿酒酵母原生质体引入到爬山虎冠瘿瘤悬浮细胞原生质体中,摄入率可达 20%。Fowke等(1979)进行了胡萝卜原生质体与衣藻无壁突变体细胞的诱导融合和培养,经显微镜检查,融合率可达 10%~20%。大多数胡萝卜原生质体中有 1~3个衣藻细胞。在融合时,衣藻的细胞器释放到胡萝卜原生质体的胞质中。含有衣藻细胞器的胡萝卜原生质体再生了细胞壁,培养 3~5 d出现细胞分裂,培养 10 d时仍可辨认出叶绿体,但未观察到线粒体与高尔基体,推测可能是被降解了。Lynch等(1989)用 PEG 诱导,使芹菜原生质体摄取了两种真菌(Fusarium oxysporum和 Aspergillus nidulars)菌丝的原生质体,摄取率可达 3%。根据光学显微镜及 DAPI染色荧光显微镜检查,从细胞核、细胞器和细胞质的情况证明芹菜原生质体已摄入了真菌。由于溶酶体的作用,真菌原生质体出现破裂,而芹菜原生质体因摄入的真菌不同,其活力也有差异,推测可能是由于真菌的进入影响了芹菜原生质体或细胞的次生物质的代谢。Davey等的研究还证实豆科植物的叶肉原生质体可以摄取根瘤菌细胞,但只有在游离原生

质体期间将细菌细胞加入到酶混合液中,摄入才能发生。这是由于在此期间发生质壁分离和细胞壁的降解,致使质膜内陷形成很多泡囊,根瘤菌细胞就是在这个过程中被泡囊所裹入的。实验结果有 5%的豇豆和豌豆的原生质体含有细菌细胞。原生质体对这些微生物的摄取有可能形成一种新的共生关系,或产生新的遗传重组,以便最终得到一种新的非豆科固氮植物。但目前这些方面的研究仍处于起始阶段。

第六节　体细胞杂交技术的应用

体细胞杂交技术不仅可以克服有性杂交不亲和或子代不育等常规远缘杂交所遇到的障碍,从而扩大杂交的范围,创造新种质,而且还能够转移多基因及胞质基因所控制的性状。特别是近年来发展起来的不对称细胞杂交技术,可以获得转移部分基因的不对称杂种或胞质杂种,从而改良现有栽培品种的个别不良性状。这些都为植物的遗传改良提供了新的途径。体细胞杂交技术与遗传转化技术相辅相成,与传统的常规育种技术相结合,将会在植物的育种实践中发挥巨大的作用。

一、通过体细胞杂交合成新物种

通过远缘不亲和的种间、属间、甚至科间的原生质体融合,往往可以把两个亲本的染色体组合在一起,形成杂合的二价体。如果杂种植株可育,并能稳定的遗传,就有可能形成农业上有用的新物种 (表 7.1)。Melchers等 (1978)用番茄 Lycopersicon esculentum与马铃薯的一个叶绿素缺失突变体进行原生质体融合,获得了一个属间杂种,被称为马铃薯番茄 (Pomato)或番茄马铃薯 (Topato)。其外形倾向于番茄植株,花和叶具有杂种的特点,并结有畸形的小果实,但在根部却没有形成块茎。Schenck等 (1982)用 PEG诱导融合,成功地实现了甘蓝与白菜型油菜的体细胞杂交,获得了人工合成的复合种甘蓝型油菜,从而证实了自然界的进化过程。Sundberg等 (1988)用白菜型油菜与甘蓝的原生质体进行融合,获得了甘蓝型油菜,具有预期的 38条染色体,大部分植株可育。

这些实验都证明通过体细胞杂交合成新的植物种是完全可能的,但目前还难以估计这一途径在作物育种上的实际意义,现多利用该方法来研究一些物种的起源与进化。

表 7.1　通过原生质体融合获得的属间体细胞杂种

杂种组合	新属
萝卜 Raphanus sativus (2n=18) +甘蓝 Brassica oleracea (2n=18)	Raphanobrassica
甘蓝 Brassica oleracea (2n=18) +Moricandia arvensis (2n=27, 28)	Moricandiobrassica
芝麻菜 Eruca sativa (2n=22) +甘蓝型油菜 Brassica napus (2n=38)	Erucobrassica
二行芥 Diplotaxismuralis (2n=42) +甘蓝型油菜 Brassica napus (2n=38)	Diplotaxobrassica
烟草 Nicotiana tabacum (2n=24) +番茄 Lycopersicon esculentum (2n=24)	Nicotipersicon
马铃薯 Solanum tuberosum (2n=24) +番茄 Lycopersicon esculentum (2n=24)	Solanopersicon
毛曼陀罗 Datura innoxia (2n=48) +颠茄 Atropa belladona (2n=24)	Daturotropa
水稻 Oryza sativa (2n=24) +稻稗 Echinochloa oryzicola (2n=24)	Oryzochloa
拟南芥 Arabidopsis thaliana (2n=10) +芸苔 Brassica campestris (2n=20)	Arabidobrassica

(引自 Chawla, 2000)

二、通过体细胞杂交培育作物新种质和新品种

通过近缘种内或种间的原生质体融合,可以获得稳定的具有双亲两套染色体的体细胞杂种植株。它们往往可育,并能直接作为育种的新材料从中选育新品种,从而可以克服有性杂交的不亲和性,将近缘栽培种或野生种的一些有益性状转移到现有栽培种中,从其后代中选育出优良新品种(系)。

体细胞杂交技术在转移与栽培种有性杂交不亲和的野生种所具有的优良抗性基因方面具有重要的意义。例如,为了利用马铃薯家族中野生种所具有优良抗逆性基因,有许多研究者曾开展了马铃薯栽培种与野生种间的原生质体融合。早在20世纪80年代初,Butenko等(1980)将栽培种一个品种的原生质体与二倍体野生种 S. chacoense的融合获得了抗马铃薯Y病毒(PVY)的杂种植株。后来的研究者多选用二倍体野生种 S. brevidens作为融合的亲本之一,因为该种对马铃薯卷叶病毒(PLRV)、Y病毒(PVY)和晚疫病都具有明显的抗性。此外,栽培马铃薯与对晚疫病有抗性的二倍体野生种 S. pinnatisectum、S. bulbocastanum和 S. circaeifolium的原生质体融合也获得了体细胞杂种植株。这些体细胞杂种在马铃薯的育种实践中都是很有价值的材料。这些研究表明,运用体细胞融合技术能够获得有性杂交不亲和的种间体细胞杂种,将野生的有益性状转移到马铃薯栽培种中。龚明良等(1995)将普通烟草与奈索菲拉烟草(N. nesophila)、光烟草(N. glauca)及黄花烟草(N. rustica)的原生质体融合,获得了种间体细胞杂种植株。对杂种植株经过多年的自交和回交选育,从中选育出了品质优良、兼抗多种病害的烟草新品系,并已开始进入生产示范及应用阶段。在果树体细胞杂交的研究中,体细胞杂种作为砧木应用,以及通过体配融合获得三倍体材料,在无核品种选育方面具有很大的潜力(邓秀新等,1995)。

体细胞杂交与有性杂交一样,在转移有益性状的同时,也会将一些不利性状转移到体细胞杂种中。这可以通过用栽培品种进行回交的方法来加以克服。因此,体细胞杂交技术与常规育种相结合,是培育农作物新品种的一条行之有效的途径。

三、通过体细胞杂交转移细胞质基因控制的性状

体细胞杂交不仅包括核基因组,也涉及到核外遗传的细胞质基因组如叶绿体和线粒体等的重组。这种胞质基因的转移创造了细胞质变异的新途径,尤其在转移细胞质基因控制的雄性不育性状方面具有重要的意义,因此,可以进一步地为育种实践服务。

一般认为,CMS(胞质雄性不育)是母性遗传性状,由线粒体DNA(mtDNA)所编码。通过常规育种的方法,CMS性状一般需要经过多次回交才能从一个品种转移到另一个品种中。而用体细胞杂交技术,则只需要经过一次操作就可以得到胞质杂种。因此,体细胞杂交是将CMS性状转移到特定品种的有效方法之一。异质融合体中核与线粒体的相互作用有可能导致雄性不育。

在植物自然群体中,有一种抗除锈剂阿特拉金(Atrazine)的突变性状也受叶绿体基因组的控制。通过原生质体融合,可以使双亲的细胞质基因融合于一体,并经重组产生胞质杂种,从其后代中可选育出抗阿特拉金的雄性不育材料。Pelletier等(1983)最先获得了具有雄性不育和抗阿特拉金的油菜胞质杂种。Chuong等(1988)将胞质雄性不育与抗阿特拉金的两个单倍体油菜的原生质体进行融合,获得了抗阿特拉金的雄性不育系。该二倍体杂种用保持系授粉时能正常结实。

为了定向地转移胞质基因控制的性状，现已经建立了“供体—受体”的实验体系，通过该体系可以获得不对称杂种或胞质杂种。Melchers等（1992）用碘乙酰胺（IOA）使番茄的叶肉原生质体失活，用γ射线或X射线照射使马铃薯或野生茄的细胞核失活，然后诱导原生质体融合获得再生植株。有5个番茄品种经诱导融合后表现出雄性不育。进一步分析mtDNA，发现这些CMS杂种的线粒体基因组中并未含有任一亲本的全部mtDNA，而且CMS的mtDNA发现有重组的现象。由此可见，这些CMS杂种是真正的胞质雄性不育细胞杂种。

在重要农作物——水稻中用原生质体融合转移胞质雄性不育性状已取得了很大的成功。Kyozuka等（1989）将雄性不育的籼稻原生质体用X射线处理后，与IOA处理过的粳稻品种Nipponbare的原生质体融合，得到了一株完全雄性不育的植株，其酯酶同工酶与粳稻完全一致。用粳稻亲本的花粉授粉后能结种子，这种特性在回交后代中能继续保持，证明它是一个稳定的雄性不育系。Yang等（1988，1989）分别用γ射线照射水稻胞质雄性不育品种A－58cms的原生质体和用IOA处理品种Fujiminori的原生质体，然后经电融合获得了胞质杂种植株。其形态特征与Fujiminori相似，染色体数为2n＝24，mtDNA与双亲有所不同，说明双亲的细胞质已有部分交换。通过测定，胞质杂种的mtDNA异质性稳定。

在油菜生产上，为了更为广泛地利用杂种优势，通过体细胞杂交转移与雄性不育和育性恢复相关基因的工作取得了显著进展。Sakai等（1996）用X射线照射具有育性恢复性状的小萝卜（Raphanus sativus）的芽游离的原生质体，然后与经过IOA处理的胞质雄性不育的甘蓝型油菜（Brassica napus）的原生质体融合，获得了恢复育性的甘蓝型油菜体细胞杂种。Heath等（1996）用一个对寒冷敏感且具有胞质雄性不育特性的花椰菜自交系的原生质体与一个抗寒但可育的芜菁原生质体融合，获得了既抗寒又具有雄性不育特性的甘蓝型油菜体细胞杂种。

到目前为止，原生质体融合已成功地在一些作物上用于遗传性状的改良（表7.2）。随着原生质体培养技术在更多物种上的突破，这一技术的应用前景将更加广阔。

表7.2　通过原生质体融合已转移的一些遗传性状

体细胞杂种		性　状
抗性		
Nicotiana tabacum	＋N. nesophila	烟草花叶病毒（tobaccomosaic virus，TMV）
Solamun tuberosum	＋S. chaccense	马铃薯X病毒（potato virus X，PVX）
N. tabacum	＋N. nesophila	烟草角蠕虫（tobacco horn worm）
S. tuberosum	＋S. brevidens	马铃薯卷叶病毒（potato leaf roll virus，PLRV），晚疫病（late blight），马铃薯Y病毒（potato virus Y，PVY）
S. circalifolium	＋S. tuberosum	疫霉属（Phytophthora）
S. melongena	＋S. sanitwongsei	茄科青枯菌（Ralstonia solanacearum）
S. tuberosum	＋S. commersonii	耐霜冻（frost tolerance）
Brassica napus	＋B. nigra	十字花科黑胫菌（Phoma lingam）
B. oleracea	＋Sinapis alba	甘蓝长尾交链孢霉（Alternaria brassicae）
B. napus	＋Sinapis alba	甘蓝长尾交链孢霉（Alternaria brassicae）
Citrus sinensis	＋Poncirus trifoliata	疫霉属（Phytophthora）

续表

体细胞杂种		性 状
Lycopersicon esculentum	+L. peruvianum	烟草花叶病毒（TMV），斑萎病毒（spotted wilt virus），耐冷性（cold tolerance）
S. lycopersicoides	+L. esculentum	耐冷性（cold tolerance）
Solanum ochranthum	+L. esculentum	番茄病虫害（tomato diseases and insect pests）
Brassica oleracea	+B. napus	黑腐病（xanthomonas campestris）
B. oleracea spp capitata	+B. oleracea (Ogura CMS line)	耐冷性（cold tolerance）
S. tuberosum	+S. commersonii	耐霜冻（frost tolerance）
R. sativa (Japanese radish)	+B. oleracea var. botrytis	根肿病（club root disease）
B. oleracea var. botrytis	+S. alba+B. carinata	甘蓝长尾交链孢霉（Alternaria brassicola），十字花科黑胫菌（Phoma lingam）
Citrullus lanatus	+Cucumis melo	根肿病（club root disease）
Hordeum vulgare	+Daucus carota	耐霜冻（frost tolerance）和耐盐性（salt tolerance）
Solanum melongena	+S. sisymbriifolium	线虫（nematode）
S. tuberosum	+S. bubocastanum	线虫（nematode）
S. tuberosum	+S. bubocastanum	根癌线虫（root knot nematode）
Raphanus sativus	+Brassica napus	甜菜囊肿线虫（beet cyst nematode）
Sinapis alba	+R. sativus+B. napus	甜菜囊肿线虫（beet cyst nematode）
品质性状		
N. rustica	+N. tabacum	高尼古丁含量（high nicotine content）
B. napus	+Eruca sativa	低芥酸（low erucic acid）
农艺性状（通过胞质杂种转移）		
N. tabacum	+N. sylvestris	链霉素抗性（Streptomycin resistance），三嗪抗性（Triazine resistance）
S. nigrum	+S. tuberosum	三嗪抗性（Triazine resistance）
B. nigra	+B. napus	潮霉素抗性（hygromycin resistance）
N. tabacum	+N. sylvestris	细胞质雄性不育（CMS）
B. campestris	+B. napus	细胞质雄性不育（CMS）
B. napus+B. campestris	+Raphanus sativa	细胞质雄性不育（CMS）和三嗪抗性（Triazine resistance）
L. esculentum	+Solanum acaule	细胞质雄性不育（CMS）
B. napus	+B. tournefortii	细胞质雄性不育（CMS）

（引自 Chawla, 2000）

第七节 体细胞杂交研究的展望与局限性

一、体细胞杂交研究的展望

植物体细胞杂交经过 30多年的发展，无论在操作技术方面，还是在基础理论研究方面都取得了长足的进展。利用体细胞杂交技术，可以克服常规育种中的有性杂交不亲和、性器官败育等

问题,从而扩大杂交的范围,创造新种质。而且,体细胞杂交还可以获得既有核基因重组,又有胞质基因重组的杂种,是实现基因重组的一条新途径,是有性杂交的有效补充,在农作物的遗传改良中具有重要的作用。

体细胞杂交对于远缘不亲和的种间、属间甚至科间遗传性状的重组具有潜在的重大应用价值。体细胞杂交能够加速与农作物有性不亲和物种中的性状转移,这种融合技术特别适合于目的基因尚未得到鉴定,但却可以在杂种细胞或再生植株中进行筛选的优良性状的转移。结合有效的筛选方案和措施,原生质体融合技术可能是目前唯一适用的、可将多基因遗传性状转移的方法。另外,植物体细胞杂交对于细胞器交换和细胞器 DNA重排所调控的胞质性状的修饰,已经证明具有很大的实际应用意义。

在已有研究的基础上,下一步要针对体细胞杂交存在的问题和薄弱环节深入开展对亲本遗传背景的了解,高效原生质体的制备与培养,提高诱导融合频率及其稳定性,杂种细胞的培养和发育,杂种鉴定技术,杂种后代的遗传规律和性状控制等方面的研究。杂交组合应逐步由近缘向远缘推进,逐渐克服不亲和性等障碍,要特别注重不对称杂种和胞质杂种的培育。同时,应注意利用原生质体的衍生系统如亚原生质体、微小原生质体和胞质体等以及性细胞原生质体。

二、体细胞杂交研究的局限性

原生质体培养是体细胞杂交的基础,但是直到目前为止,也只有 360多个种的原生质体培养再生了完整植株,大多数重要的植物尤其是木本植物如葡萄、棕榈、菠萝、橡胶、茶、香蕉、椰子和芒果等的原生质体再生仍然很困难,或者还未进行深入研究。在原生质体再生的物种中,茄科(Solanaceae)占了将近 1/4,并且用于育种目的的大多数体细胞杂种或胞质杂种也比较集中于 Solanum(茄属)、Nicotiana(烟草属)、Medicago(苜蓿属)、Citrus(柑橘属)、Brassica(芸苔属)和 Lycopersicon(番茄属)等 6个属中。因此,为了有效地进行植物遗传改良,不但要使杂种细胞再生成完整植株,而且还必须提高植株再生的频率,以便有足够的群体进行有效的选择。但目前存在的一个普遍问题是许多原生质体再生的程序似乎效率较低,重复性较差,并且还具有基因型的依赖性。为了将体细胞杂交技术应用于更多的植物中,还需要更加深入地研究植物细胞的分化、脱分化和再分化等发育的机制。

体细胞杂交与有性杂交不一样,除了涉及双亲的细胞核外,还涉及了双亲的细胞质。它不仅可以使双亲的细胞核发生基因重组,还可以使双亲细胞质中的叶绿体基因组和线粒体基因组重新组合。这可以为遗传育种提供新的材料和资源,但同时又带来了较为复杂的关系。应用体细胞杂交技术可以克服部分远缘组合间的不亲和性,但尚不能从根本上解决此问题。虽然可以诱导任何两个物种间的原生质体融合,然而,目前获得的体细胞杂种植株仍限于少数物种。

另外,由于难以控制供体和受体基因组有丝分裂和减数分裂中的重组行为,因此,转移期望基因和性状的概率较小。这是限制目前体细胞杂交技术在育种实践中应用的一个主要障碍。在基因重组过程中还有可能整合一些不需要的基因或缺失一些有益基因,从而造成所获得的杂种材料产生较大的遗传变异而难以应用于育种实践。体细胞杂交在改良作物的育种实践中曾经对它的应用潜力估计过高,实践证明并非像人们想像的那么简单,要获得期望的体细胞杂种植株难度仍然很大。

体细胞杂种难以应用于育种实践中的另一个问题是大多数种间体细胞杂种不育,或育性较

低,或花粉活力较低。除了那些无性繁殖作物之外,不育的体细胞杂种植株很难应用到育种实践中,因为一般体细胞杂种植株是通过回交的办法来逐渐减少供体基因组的成分,保留所期望的基因或性状,从而达到改良作物的目的。体细胞杂交作为一种育种的新途径,还必须与常规育种技术相结合,才能为作物遗传改良作出更大的贡献。

思考题

1. 植物体细胞杂交的概念和类型。
2. 对称融合和非对称融合的概念及非对称融合的作用。
3. PEG融合与电融合的原理及影响因素。
4. 杂种细胞的选择方法。
5. 如何用分子生物学方法鉴定杂种植株?
6. 通过哪些途径可以进行原生质体的遗传饰变?
7. 体细胞杂交技术的应用及还需要进一步研究解决的问题。

第八章

人 工 种 子

植物繁殖特别是无性繁殖植物的繁殖需要占用大量耕地,同时,自然田间繁殖而造成的病虫害传播也给农业生产带来负面影响。因此利用实验室生产试管苗作为植物繁殖的方式,已在许多无性繁殖植物中应用。然而,由于试管苗移栽和远距离运输的不便,在使用中存在许多限制。人工种子作为有可能替代传统种子和试管苗的新的繁殖体,由于其具有健康、可远距离运输、节省耕地等优点,因此,具有较大的潜在应用价值。自 20世纪 70年代提出人工种子的概念以来,人工种子受到了生物学界的高度重视,在这一领域的研究已取得了众多有意义的进展。迄今为止,已对胡萝卜、芹菜、西洋参和苜蓿等多种植物的体细胞胚人工种子进行了包括体细胞胚的规模化生产,人工种皮研制和人工种子生产工艺等方面的系统研究,为人工种子的应用奠定了一定基础。

第一节 人工种子的概念

人工种子 (artificial seeds) 又称合成种子 (synthetic seeds) 或体细胞种子 (somatic seeds)。人工种子的概念首先是 1978年由 Murashige在第四届国际植物组织细胞培养大会上提出的。他认为,随着组织培养技术的不断发展,可以用少量的外植体同步培养出众多的胚状体,将这些胚状体包被在某种胶囊内使其具有种子的功能,则可能直接用于田间播种。他的这一设想立即引起了许多科学家的兴趣。1981年 Lawrence等报道了芹菜和莴苣体细胞胚包裹的液胶包埋技术。其后有越来越多的人工种子方面的报道,如 Kitto种皮包裹的芹菜丛胚人工种子和用水凝胶包裹苜蓿单胚的人工种子等。

由于体细胞诱导在植物种类上的局限性,同时也因为体细胞胚在群体上的变异、木本植物经过胚途径繁殖其幼年期较长等问题,使体细胞人工种子的应用受到很大限制。因此,人们开始设想利用其它离体培养的器官如微芽、微型变态器官等用于人工种子生产。自 1987年桑树腋芽包裹的人工种子获得成功以来,以微器官为繁殖体的人工种子研究日益增多,如莴苣不定芽人工种子、桉树微枝或微芽人工种子、兰花原球茎人工种子、百合小鳞茎人工种子,以及以一些植物茎尖包裹的人工种子等。现有报道显示,由于植物种类、诱导繁殖体的方法以及对作物遗传稳定性要求的不同,人工种子的种类可以有多种类型。因此,人工种子的涵义已不仅仅局限于由人工种皮包被的体细胞胚的范畴。

日本学者 Kamada (1985) 首先将人工种子的概念延伸,认为使用适当方法包埋组织培养所获得的具有发育成完整植株的分生组织 (芽、愈伤组织、胚状体和生长点等)、可取代天然种子播种的颗粒体均为人工种子。以后的研究进一步发现,一些具有特殊繁殖器官的植物如块根、块茎

和鳞茎植物在离体培养时也可产生与自然条件下相似的器官,且这些微器官由于体积比芽和胚状体大,含有一定的贮藏物质如淀粉、蛋白质等,它们在不经过任何包被的情况下即可形成健壮植株。因此,陈正华等(1998)将人工种子的概念进一步扩展为:任何一种繁殖体,无论是在涂膜胶囊中包裹的、裸露的或经过干燥的,只要能够发育成完整的植株,均可称之为人工种子。

人工种子根据包被情况和繁殖体类型有两种分类方法。根据其包被的需要程度可分为3类:第一类是裸露的或休眠的繁殖体,如可以适当干燥的体细胞胚(如鸭毛草的体细胞胚)、休眠的微鳞茎和微块茎等,它们在不加包被的情况下也具有较高的成株率;第二类为人工种皮包被的繁殖体,一些体细胞胚、原球茎等虽不能过度干燥,但只需人工种皮包被即可维持良好的发芽状态,如胡萝卜体细胞胚;第三类是水凝胶包埋再包被人工种皮的繁殖体,大多数体细胞胚、不定芽、茎尖等均需要先包埋在半液态凝胶中,再经人工种皮包裹才能避免失水,从而维持良好的发芽能力。根据繁殖体的类型人工种子可分为两类:一类是体细胞胚人工种子;另一类是非体细胞胚人工种子。

早期人工种子研究多以胡萝卜、芹菜等植物的体细胞胚为主要对象,但近年来已扩大到许多植物类型。据报道,目前已对26个科、36个属的植物进行了人工种子研究(陈正华等,1998)。人工种子的研究范围显示出两大特点:一是重要的经济作物、粮食作物以及多年生经济林木的人工种子报道日益增多;二是以微器官为繁殖体的报道呈增加趋势,其中包括微芽、微枝、原球茎、小鳞茎和小块茎等。表8.1和表8.2分别列出了部分以体细胞胚和器官为繁殖体的人工种子的研究结果。从现有研究趋势看,人工种子实用技术更可能会在微器官为繁殖体的植物中首先得以应用。我们实验室在研究马铃薯试管块茎形成机理的基础上形成了马铃薯试管块茎规模化生产技术。试管块茎作为微型变态器官类型的人工种子,在不经过任何包被的情况下可以在田间直接正常生长,其产量与常规种薯相当(图8.1)。

表8.1 以体细胞胚为繁殖体的人工种子

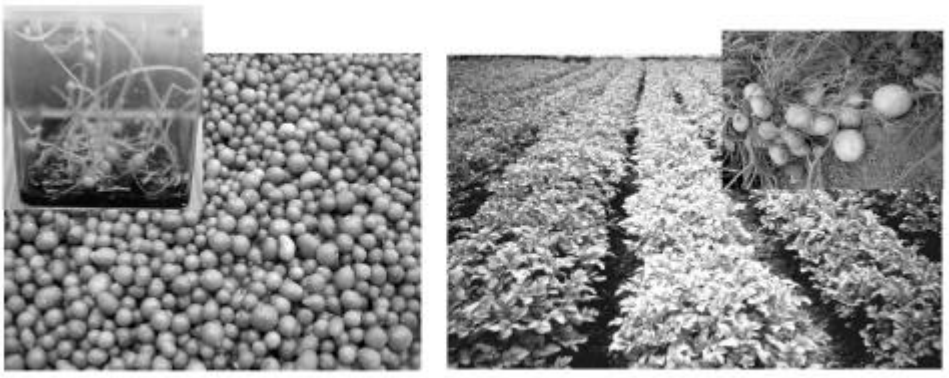
物 种	主 要 结 果
胡萝卜(Daucus carota)	有菌土壤中发芽成苗
苜蓿(Medicago sativa)	有菌条件下发芽成苗
芹菜(Apium graveolens)	有菌条件下发芽成苗
柑橘(Citrus sinensis×C. reticulata)	无菌条件下发芽成苗
挪威云杉(Picea abies)	无菌及有菌条件下发芽
松树(Pinus lambertiana, P. taeda)	无菌及有菌条件下发芽
玉米(Zea mays)	无菌条件下发芽成苗
杂交水稻(Oryza. sativa×O. latifolia)	无菌条件下发芽
橡胶树(Hevea brasiliensis)	无菌条件下发芽
西洋参(Panax quinquefolium)	无菌条件下发芽
刺五加(Acanthopanax senticosus)	无菌及有菌条件下成苗
黄连(Coptis chinensis)	无菌及有菌条件下成苗
大麦(Hordeum vulgare)	无菌条件下发芽
芥菜(Brassica juncea)	无菌及有菌条件下发芽
小麦(Triticum aestivum)	无菌及有菌条件下发芽

(引自陈正华等,1998)

表 8.2　以器官为繁殖体的人工种子

物　种	繁殖体	主　要　结　果
印度桑 (Morus indica)	芽	无菌条件下发芽成苗
檀香 (Santalum ablum)	芽	无菌条件下发芽成苗
花叶芋 (Caladium bicolor)	芽	无菌条件下发芽成苗
日本百合 (Lilium japonicum)	小鳞茎	无菌条件下发芽成苗
直杆桉树 (Eucalyptusmaideni)	侧芽	无菌条件下发芽成苗
莴苣 (Lacyuca sativa)	芽	无菌及有菌条件下发芽成苗
赤桉 (Eucalyptus camaldulensis)	微芽	有菌土壤中发芽成苗
缬草 (Valeriana wallichi)	微芽	无菌及有菌条件下发芽成苗
华腺萼木 (Mycetia sinensis)	微芽	有菌土壤中发芽成苗
杨树 (Populus beijing)	芽	无菌条件下发芽
大花蕙兰 (Cytobium)	原球茎	无菌条件下发芽
石槲兰 (Dendrobium)	原球茎	无菌条件下发芽
唐菖蒲 (Gladiolus hortalans)	球茎	无菌条件下发芽
香蕉 (Musa acuminata)	微芽	无菌条件下发芽

(引自陈正华等,1998)



a　　b

图 8.1　马铃薯试管块茎人工种子及其田间生长情况
a 马铃薯试管块茎人工种子;b. 试管块茎田间种植生长

与试管苗技术和自然有性繁殖种子相比,人工种子具有以下突出的、甚至是不可取代的优点:其一,在无性繁殖植物中,有可能建立一种高效快速的繁殖方法,它既能保持原有品种的种性,又可以使之具有实生苗的复壮效应;其二,可以对优异杂种种子不通过有性制种而快速获得大量种子,特别是对于那些制种困难的植物更具有重要的实用意义;其三,对于一些不能正常产生种子的特殊植物材料如三倍体、非整倍体、基因工程植物等,有可能通过人工种子在短期内加大繁殖应用;其四,与田间制种相比,可以节省制种用地,且不受季节限制,可以实现工厂化生产,同时还避免了种子携带病原菌的危险;其五,与利用试管苗相比,可避免移栽困难,实现机械化操作,还便于储藏和运输。

第二节 繁殖体的类型及其生产

繁殖体是人工种子的主体。早期的研究认为,体细胞胚是人工种子制备的最佳繁殖体,因为它具有完整的种子结构,且繁殖数量大,速度快,因而许多研究者一直致力于体细胞胚的实用化研究。然而近年来的研究结果表明,以体细胞胚作为繁殖体并不适用于所有的植物。由于诱导条件的影响,体细胞胚群体的变异比其它器官繁殖体的遗传变异更大,因而难以保持母体品种的一致性,从而限制了它的使用范围。此外,许多植物的体细胞胚诱导十分困难,也限制了人工种子技术的发展。随着植物离体培养技术的不断完善,一些植物微型器官的规模化生产技术也相继诞生,给微器官作为人工种子繁殖体的应用奠定了基础。据陈德富等 (1995) 的统计,在 1990 年,有关人工种子的报道以体细胞胚为繁殖体的占 63.6%,以芽为繁殖体的报道占 36.4%;到 1994年,以体细胞胚为繁殖体的报道则只占 48.8%,以芽为繁殖体的占 38.1%,另有 13.1%为其它类型的繁殖体。从这一统计数据可以看出,人工种子的研究趋势可能会在离体培养技术发展的基础上,根据不同的植物繁殖特点和培养技术的成熟程度,将不同繁殖体应用于人工种子中,这将更有利于人工种子的实用化。

一、不同类型繁殖体比较

1. 诱导培养方式

离体培养过程中,外植体的发育途径可分为体细胞胚途径和器官发生途径,这已在本书的前面有关章节中详细介绍。在一定条件下,发育途径是由培养基和培养条件来调控的。在仅以获得再生植株为目的的培养中,外植体的发育途径并不需要严格的控制,一般同一试验中,可能有的外植体产生体细胞胚,有的通过器官发生成苗。但对于以制备人工种子为目的的繁殖体培养来讲,首先必须确定适当的繁殖体类型,然后必须有获得高产、一致的繁殖体的配套培养技术。因此,作为以人工种子生产为目的的诱导培养技术,在发育的同步化和群体的规模化上具有更高要求。由于繁殖体的类型不同,其生产调控技术也不尽相同。表 8.3列出了部分植物不同繁殖体的诱导条件,可以看出,体细胞胚的生产程序与器官繁殖体有着明显的不同。一般来讲,体细胞胚的诱导和形成需要经过至少两个阶段:第一阶段,在含高生长素浓度的培养基中,诱导培养胚性细胞;第二阶段,在较低生长素或无生长素的培养基中形成体细胞胚。与体细胞胚形成相比,微器官的发生则一般只需一个培养程序,但有时为了增加繁殖体的数量,也需进行一定次数的继代。此外,有些块茎、块根、鳞茎和球茎类繁殖体的形成,可能需要经过不同的诱导程序。总之,培养条件及培养程序需要根据繁殖体的类型以及植物类型来确定,从而使之适用于特定植物的繁殖体生产,形成稳定的培养体系。

目前,许多植物的繁殖体已有自己独特的培养体系。并且越来越多的研究表明,每一特定技术体系的形成,将意味着以该技术为依托的植物人工种子产业的建立,从而有可能真正实现农业生产的工厂化。如以马铃薯试管块茎为繁殖体的种薯生产技术,目前已开始进入产业化阶段,它有可能成为商业化人工种子利用的产业技术。

2. 不同繁殖体成苗率比较

表 8.3　部分植物体细胞胚和微器官繁殖体诱导的培养条件

植物种类	繁殖体类型	培养程序及培养天数	培养基及蔗糖浓度	激素浓度／(mg/L)					其它成分及浓度
				2,4－D	NAA	Zeatin	BA	Kin	
芥菜型油菜	体细胞胚	Step I，21	MS，3%	2.0	1.0	1.0	—	—	LH，100mg/L
		Step II，21	MS，3%	0.1	—	1.0	0.5	—	LH，100mg/L，谷氨酰胺，500mg/L
	微芽	21	MS，3%	—	0.05～0.2	—	5.0	—	—
桉树	体细胞胚	Step I，20	B5，4～5%	2.0～4.0	—	—	—	1.0	—
		StepII，28～56	改良 H，3%	—	0.2～0.5	—	0.5	—	ADE，40mg/L
	微芽	25	改良 H，3%	—	0.2～0.5	—	0.5～2.0	—	ADE，40mg/L
茶树	体细胞胚	Step I，28	MS，4%	0.5～1.0	—	1.0	0.5	—	—
		Step II，30	MS，2% ～3%	—	—	1.0	0.5	—	GA，0.3mg/L，IAA，0.3～0.5mg/L
	不定芽	25	MS，2% ～3%	—	1.0	1.0	—	—	IAA，0.3mg/L
华腺萼木	体细胞胚	Step I，25	MS，3%	1.0	0.2	—	1.0	—	—
		Step II，20	MS，0.2% ～0.3%	—	0.2	—	1.0	—	—
	不定芽	25	MS，2% ～3%	—	0.01	—	0.2	—	IAA，0.3；GA，0.1mg/L
兰花	原球茎	25	MS，2%	—	0.1	—	—	—	椰子汁，10%

(引自陈正华，1998)

近年来对不同繁殖体人工种子发育与成苗能力的研究表明，不同繁殖体类型的人工种子在成苗能力上存在很大差异。陈正华等 (1998) 对茶树和华腺萼木的体细胞胚人工种子和不定芽人工种子的成株率的研究发现，茶树不定芽人工种子的成株率为 77%，而体细胞胚人工种子的成株率只有 17%；华腺萼木的不定芽人工种子成株率可达 93%，而体细胞胚人工种子的成株率只有 53%。产生这一结果的主要原因是由体细胞胚人工种子的不正常株率高而造成的 (表 8.4)。Ronchi 和 Giorgetti (1994) 认为，由于原胚细胞 (pro－embryogenic cell) 发生需要较高的生长素水平，其实质是对培养细胞的一种胁迫，从而导致一些体细胞胚发育不正常，因而使体细胞胚的成株率降低。这一现象也表现在一些液体培养的体细胞胚生产中。此外，体细胞胚之间生理上的不同步也是普遍存在的现象，从而也影响成苗率。

表 8.4　不同繁殖体成苗所需时间及成株率

植　物	繁殖体类型	正常株数	百分比	非正常株数	百分比	成苗所需天数
茶树	体细胞胚	17	17	83	83	10～60
	不定芽	77	77	13	13	20～25
华腺萼木	体细胞胚	47	53	42	47	40～60
	不定芽	466	93	34	7	20～25

(引自陈正华等，1998)

Padmanabhan等 (1998)在甘薯体细胞胚研究中证明,甘薯液体培养产生的体细胞胚在进入鱼雷期和子叶期后,经组织学观察按结构的完整性可分为 5种类型:结构完整、结构基本完整、无分生组织活性、结构不完整以及增生型 (图 8.2)。发芽试验显示,只有前两种类型具有形成植株的能力。朱 等 (1990)对胡萝卜体细胞胚按大小分 3级进行分选,结果显示,第 I 级大小在 1.5 mm以上的体细胞胚,基本为发育成熟的胚,其人工种子发芽率可达 87.3%;第 II 级大小在 1.0 mm左右,其发育时期处于鱼雷期至成熟期,发芽率为 75.3%;第III级大小在 0.5 mm以下,基本为非成熟胚,其发育时期从球形胚到鱼雷期胚,发芽率只有 55.5%。

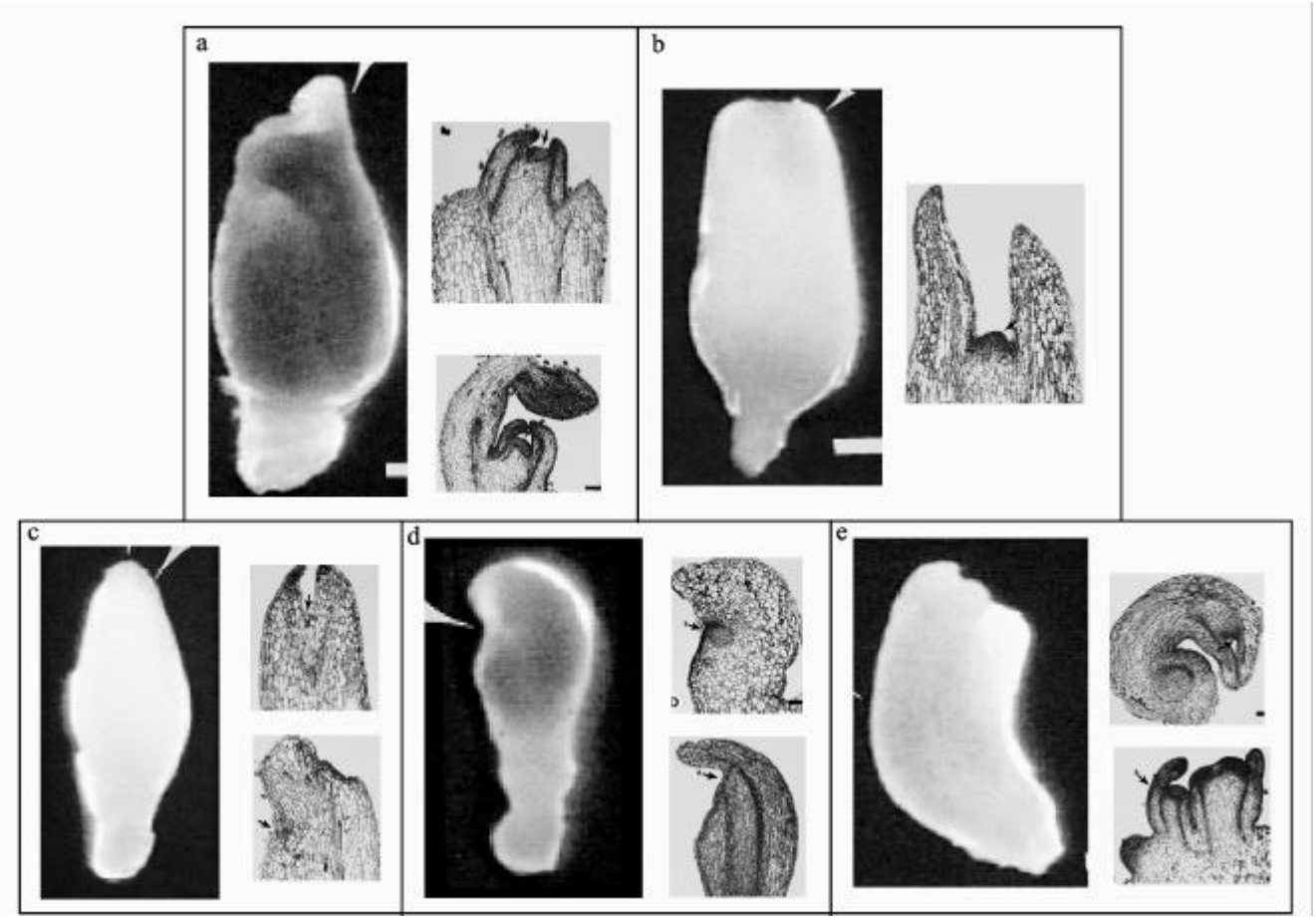


图 8.2 甘薯体细胞胚
a 胚结构完整;b. 胚结构基本完整;c. 无分生组织活性;
d. 结构不完整 (发育中断);e. 增生型
引自 Padmanabhan等, 1998)

以非体细胞胚为繁殖体的人工种子在大多数报道中均具有较高的成株率,但不同植物类型和繁殖体类型间有较大差异。由于缺乏同一植物同一试验的体细胞胚和非体细胞胚人工种子的资料,因此,由于试验条件的不同,很难对其进行直接比较。但从目前的不同报道看,一般以与自然繁殖相同的微器官为繁殖体的人工种子,具有较高的成株率。如兰科植物自然条件下可用球茎繁殖,马铃薯自然条件下用块茎繁殖,百合科植物用鳞茎繁殖,如果离体条件下诱导成同样的微器官作为繁殖体,则成株率很高。Shashi (1993)以原球茎制作大花惠兰人工种子,无菌条件下的发芽率达 100%。黄美娟和朱 (1991)在花叶芋人工种子研究中,以芽球为繁殖体,其成株率也达 100%。在香蕉顶芽为繁殖体的人工种子研究中,也获得 100%的成株率 (Rao, 1993)。一些可以扦插繁殖的多年生林木人工种子研究也显示,以腋芽为繁殖体均有较高的成株率如桉树、榆树等。以不定芽为繁殖体的人工种子中,其成株率则因植物种类不同而有较大差异,如倪德祥

等（1994）在同一试验中观察到，紫参和安祖花不定芽人工种子的发芽率分别分 72.7%和 11.3%。事实上，人工种子的成株率在很大程度上与繁殖体质量有关。人工种子要成为真正的实用化技术，高质量、大批量生产繁殖体的技术是其基本前提。一些具有高成株率的植物，基本上均具有相对成熟和稳定的繁殖体生产技术体系。

二、繁殖体的生产

作为种子使用的繁殖体，首先必须要有较高程度的一致性。这种一致性除了遗传学上的一致性外，还包括生理上的一致性。因为人工种子一旦商业化，它与自然种子一样即是特殊的商品，它需要有生产出整齐一致的农产品的能力。其次需要有足够的数量，以满足农业生产的需要。因此，相对于一般离体培养技术来讲，人工种子繁殖体的培养技术需要更高的成熟度和可批量化的生产技术，在保证繁殖体数量的同时，还需维持繁殖体遗传上的稳定性和发育上的同步性。从表 8.3可以看出，由于繁殖体类型不同，其培养方式也不相同。在实际应用中，其技术规程可能更加复杂。即使是同类繁殖体，因为植物种类不同，所要求的培养条件和生产程序也会有差异。这里仅按体细胞胚、营养变态器官和微芽等三大类进行概括性介绍。

1. 体细胞胚的规模化生产

在离体培养中体细胞胚的产生是普遍存在的。作为一种离体培养再生途径，只要能形成完整植株，试验中常常对其它方面考虑较少。因此，通过一定的诱导技术，几乎在能够离体培养再生植株的各种培养中均可观察到体细胞胚的形成，包括花药培养、小孢子培养以及原生质体培养等。但这些培养体系中的体细胞胚往往处于胚胎的不同发育时期，对于作为人工种子繁殖体的体细胞胚而言，它必须要满足以后成苗率高、发芽一致的要求，因而需要同一培养体系的体细胞胚的发生和发育基本同步。诱导体细胞胚同步形成的技术因此也是以体细胞胚为繁殖体的人工种子技术的关键。目前，采用的方法多基于细胞同步生长诱导的策略，其技术措施在前面已有详述，这里不再重复。需要说明的是，到目前为止，严格的体细胞胚的同步化问题依然是尚未解决的难题。而且由于植物种类和外植体来源的差异，同步化效果也不尽一致，应针对具体的研究或生产对象，根据试验结果确定适宜的调控技术。

Jitender和 Manchikatla（1998）将茄科植物体细胞胚的形成划分为 4个阶段：胚性愈伤组织形成、形态发生感受态的获得、胚胎发生程序表达、胚发育及其成熟。前两个时期与体细胞胚形成的数量有关（生产效率），而后两个时期则与体细胞胚的质量相关。同时，在第二个时期，细胞进入胚胎发生感受态的一致性与否，又直接关系到大批量生产中体细胞胚群体的一致性。目前，许多调控体细胞胚同步化的措施，事实上就是使细胞同步进入胚胎发生感受态，从而提高同批次培养中的体细胞胚发育阶段上的一致性。作为人工种子繁殖体的体细胞胚，除了发育上的同步化外，还必须具有如下标准：其一，形态正常，具有完整的胚结构；其二，与母体植物的基因型基本相同，特别是在重要经济性状和农艺性状上没有变异；其三，具有较好的成熟性，能耐一定程度的脱水。

体细胞胚作为人工种子繁殖体另一个需要解决的问题是批量化生产技术。通常离体培养体系多分为液体培养和固体培养，一般在三角瓶、培养盒等容器中进行，但这种实验室培养的方法显然不能满足大规模生产的需求。自从胡萝卜以悬浮细胞大量生产体细胞胚得以成功以来，对体细胞胚规模化生产技术的研究已在许多植物中展开，在一些体细胞胚培养技术较为成熟的植

物中已形成相对稳定的规模化生产体系。Choi等 (2002) 建立了人参体细胞胚大规模液体培养体系,每 500ml容器可生产体细胞胚 12 000个 (图 8.3)。在体细胞发育至子叶期早期时,将其转入 1/2 MS无机盐附加 9%蔗糖浓度的培养基中诱导进入休眠,获得了良好效果。其它一些植物如芹菜、苜蓿等体细胞胚的批量化培养也取得类似结果。但总体上讲,体细胞胚规模化培养技术的应用可能比体细胞的胚诱导更为复杂。从目前的研究结果来看,不同的植物其体细胞胚诱导生产的程序和条件很难同一,这就意味着很难设计出一个满足于不同要求的通用的大规模生产设施,而必须根据不同的要求设计个性化的设备,但这又势必增加培养成本。因此,从这个意义上说,体细胞胚繁殖体大规模培养的成功,除了生物学本身的因素外,还需要有相应的工程学技术的配合。

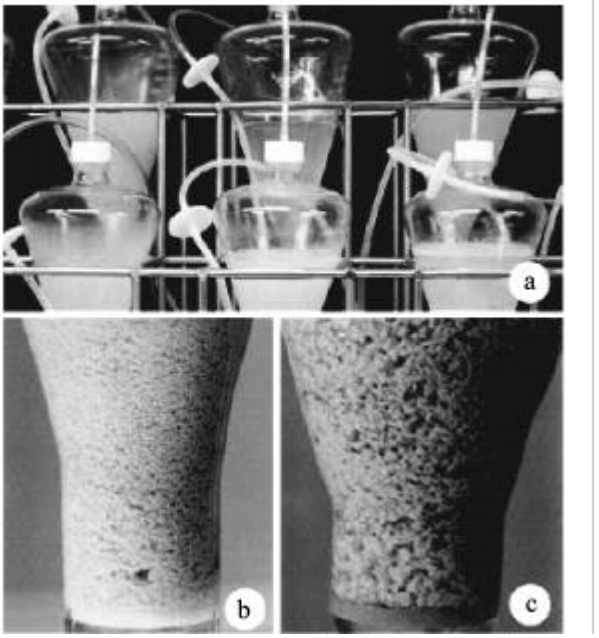


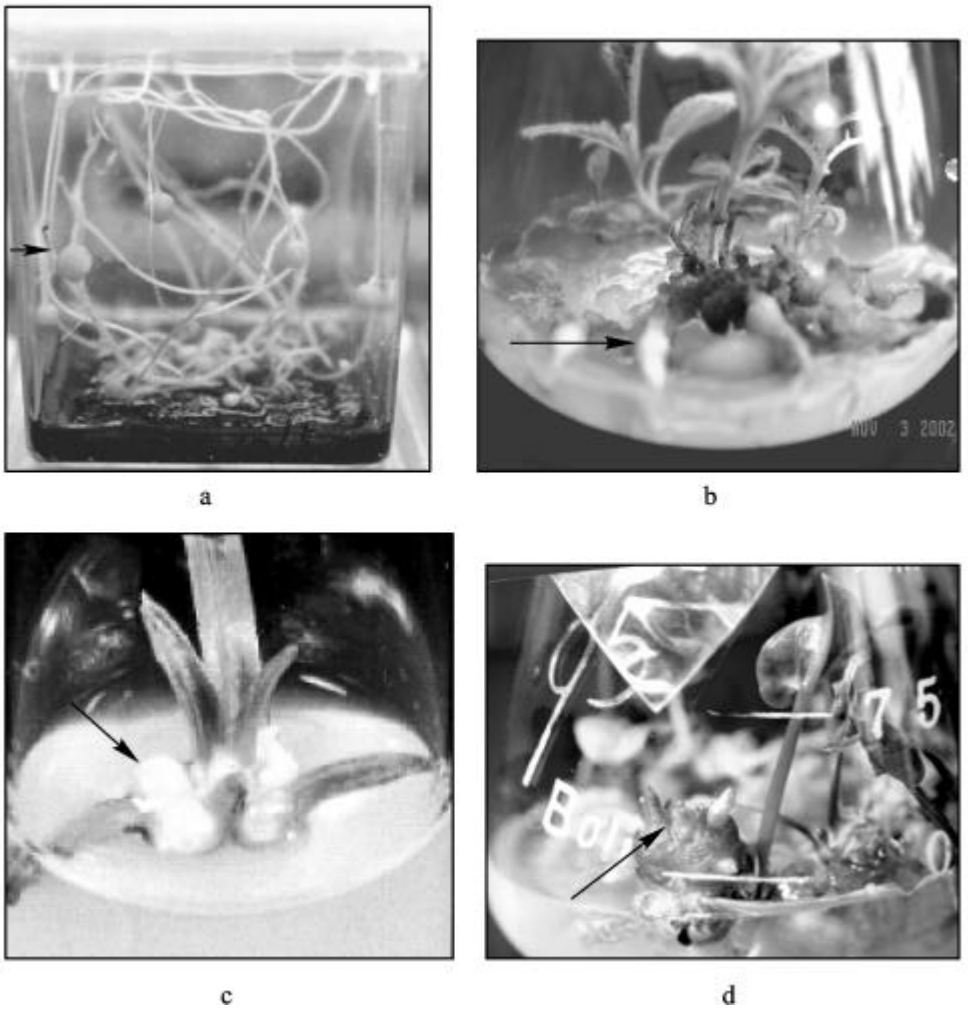
图 8.3 人参体细胞胚生物反应器培养
a 3 L容量的生物反应器;b 胚性细胞转入反应器后 3周形成心形胚;c 培养 4周后形成子叶形胚
(引自 Choi和 Jeng, 2002)

2. 微型营养变态器官繁殖体的培养

许多能够产生块茎、鳞茎、球茎等器官的植物,其营养变态器官通常又是这些植物的繁殖器官。离体培养条件下,这些变态器官亦可以通过一定的控制条件诱导产生 (图 8.4)。目前,已在马铃薯、百合、兰科植物、生姜、芋属植物和薯蓣等多种植物中成功诱导形成了营养变态器官。由于培养形成的这类器官体积小、成苗率高、不带任何病原物,因而越来越受到科学家和生产者的关注。有人预言,由于常规的利用营养变态器官繁殖植物的生产程序复杂、病虫害控制难度大、繁殖系数低、占用耕地多,因此,离体条件下的微型变态器官作为人工种子,有可能首先在这些植物上得以实际应用。然而,由于植物变态器官的种类多,在自然条件下不同类型的植物所处的生长环境差异很大,离体培养时对诱导条件的要求也各不相同,因此,不可能有一个统一的生产模式,需根据不同植物的特性形成相关的技术体系。此外,尽管目前这类植物在多数培养中均观察到离体变态器官的形成,但能实现批量化和同步化生产的植物还十分有限。

现有研究表明,根据不同植物的生长特性,研究其离体培养下变态器官形成的机理及其诱导条件,是实现其高效生产的前提。马铃薯是到目前为止对试管块茎在离体条件下的发生发育机理研究最为系统的植物。研究证明,离体培养下形成的块茎与田间生长的块茎具有相同的组织结构和生理特性,这也是其可以作为人工种子应用的基本条件。同时,试管块茎形成所需要的光照和温度条件也与自然条件下一致。其它一些植物离体培养中营养变态器官的发生也有类似的结果。此外,由于离体培养条件下的器官形成完全由人工控制,因此,培养基的主要成分及附加成分对诱导效率有较大影响。根据已有研究资料分析,以离体营养变态器官为培养目的时,至少应考虑如下几个因素。

① 光照 能够形成变态器官的植物常常具有光照周期上的双重需要,即某一光周期有利于开花,相反的光周期则有利于变态器官的形成。如马铃薯在自然条件下长日照有利于开花,而短日照有利于块茎形成。离体培养条件下,如果在长日照下则只能生长试管苗,而短日照则可促进



a　b　c　d

图 8.4　几种植物培养条件下形成的营养变态器官（如箭头所示）
a. 马铃薯试管块茎；b. 地黄试管根茎；c. 百合试管鳞茎；d. 半夏试管块茎

试管块茎的形成。除了光照时间的长短外，光照强度亦是影响变态器官形成的重要因素。不同植物形成变态器官所要求的光照强度往往有很大差别，如百合在弱光下能形成鳞茎，而莲藕则需要较强的光照才能形成根状茎。陈春满等（2001）在兰属植物象牙白（Cymbidium eburneum Ldl. Var. album）的离体培养中发现，光照强度对原球茎的体积有显著影响，在 3 000 lx/m² 的光照强度下，其增殖率比 1 000 lx/m² 和 2 000 lx/m² 的光照强度高 30%。

② 温度　有些变态器官的形成往往需要低温诱导，这可能与植物对温度的胁迫反应有关。离体培养条件下的马铃薯，当温度在 18～20℃时试管块茎可以正常形成，温度高于 22℃时试管块茎形成很少，温度达到 25℃后，试管块茎则完全不能形成。一些试验还显示，在变态器官的形态建成后，一定的昼夜温差比恒温更有利于器官膨大。但由于不同的植物对自然条件的适应性不同，因此所要求的温度条件也有很大差异。如芋、莲藕以及一些起源于热带的球茎花卉等植物，其变态器官的形成要求较高的温度，而对于那些喜冷凉的植物则要求较低的温度条件。因此，在离体培养下诱导变态器官形成时，必须充分考虑自然条件下该植物变态器官产生所需要的温度条件。

③ 激素　植物的生长与发育通常与内源激素水平的变化和平衡状态有关。自然条件下，马铃薯块茎形成前夕植株体内的 GA 含量下降，而 ABA 含量上升。离体条件下特定器官的形成也

受激素的调控。因此,在诱导变态器官形成的研究中,添加外源激素的试验较多。但遗憾的是,许多研究却并没有达到人们预期的效果,这主要是因为外源激素的调控作用主要是通过调节内源激素的变化而实现的,而这又与培养条件、植株生长发育状况等有关。因此,外源激素的种类和浓度必须经过严格试验以后才能确定。罗桂芬等 (2001) 在盾叶薯蓣珠芽发生中观察到,盾叶薯蓣珠芽形成数量主要与 BA有关,而珠芽大小则与生长素有关,在试管苗生长健壮的前提下,较低浓度的外源激素有利于珠芽的形成。薛建平等 (2003) 在地黄叶片直接发生根茎的试验中发现,在培养基添加 1.0mg/L的 BA和 0.1mg/L的 NAA时,从叶片中脉可直接形成 2～4个试管地黄。

④ 培养基蔗糖浓度 蔗糖是植物离体培养中常用的碳源,培养基中的蔗糖浓度常在调控植物发育途径中起到重要作用。现有研究资料显示,培养条件下的变态器官形成与培养基的蔗糖浓度有关,较高的蔗糖浓度对于一些植物的微型变态器官形成具有促进作用。马铃薯试管块茎的形成需要培养基的蔗糖浓度达到 8%,而且已从马铃薯植物中分离获得了对于蔗糖浓度具有应答反应的基因启动子。罗丽萍等 (2001) 在龙牙百合小鳞茎的培养中也证明,8%的蔗糖浓度可显著提高鳞茎体积。在其它一些以淀粉为主要贮藏物质的营养变态器官的形成中也表现出相似的趋势,如莲藕、芋等。但不同植物所要求的具体浓度有一定差异。浓度过高,由于培养基的渗透压过大,可能影响组织对营养物质的吸收,反而抑制器官的膨大,有时甚至造成毒害。如地黄根茎的形成和膨大以 6%的蔗糖浓度为宜,超过此浓度则抑制培养物的生长。

3. 芽繁殖体的培养

除了体细胞胚和微型变态器官可以作为人工种子的繁殖体外,茎尖、微芽和不定芽等作为繁殖体的人工种子研究也有报道。大多数情况下,微芽、不定芽的培养往往直接从外植体上直接诱导形成,培养方式简单,且勿需高浓度的激素处理,因此,所产生的繁殖体能保持原有植物的品种特性。根据不同的植物类型,可选取不同的外植体作为芽产生的来源,如非洲紫罗兰一般选用叶片为外植体,诱导不定芽作为微繁殖体;榆树、槐树等植物则可选根作为外植体产生微芽;石竹类花卉可以茎尖为外植体培养侧芽作为繁殖体。

作为人工种子繁殖体的芽必须生长健壮,同时要具有适宜的体积大小,一般以 1～3mm为宜,且叶片小、结构紧凑,以便于包埋。有关芽的培养可以参考第三章的有关内容,但在获得足够的繁殖体数量的同时,亦需注意芽发育阶段上的同步化诱导。同时,作为批量化生产,在一些技术环节上也应进行适当改进。谷瑞升等 (1998) 在桉树芽繁殖体的同步化生产研究中认为,在不定芽包被的前一次继代培养时,采用光/暗培养 16 d后再转入全黑暗培养 4 d,有利于芽的同步化和获得大量的适宜体积的芽。Escalona等 (1999) 利用一个简易的液体培养系统进行凤梨微芽培养,不仅获得了较好的规模化生产量,也获得了较好的同步化效果。

第三节 人工种子包被

严格地讲,完整的人工种子应该由 3个部分组成:繁殖体、人工胚乳和人工种皮。特别是以体细胞胚和芽为繁殖体的人工种子,包被是必不可少的。人工种子包被的制作主要经过繁殖体预处理、包埋和种皮包被等环节。

一、繁殖体的预处理

成批培养的繁殖体在进行人工种子组装之前需要进行筛选和处理，不同类型繁殖体的处理方法有所不同。体细胞胚形成后，需要在无激素的培养基上经过一定阶段的后熟培养，然后进行脱水干燥，再将畸形胚选出后才能进行包埋。研究显示，经过脱水处理的体细胞胚人工种子，经过贮存后仍具有较高的成苗率。如经脱水后含水量只有 8% ～15%的苜蓿体细胞胚人工种子，在贮存 12个月后其成苗率仍然可达 60%以上。Choi和 Jeong (2002) 在人参人工种子制备中，采用 9%的蔗糖培养基对体细胞胚进行预处理，使体细胞胚进入休眠，经包被后人工种子可长期贮藏并有较高的发芽率。ABA分析显示，经过高浓度蔗糖处理的体细胞胚的内源 ABA含量明显高于处理前的体细胞胚，亦高于在低浓度蔗糖处理条件下的胚。有些研究认为，在脱水之前用 ABA处理体细胞胚也可强迫其进入休眠，更有利于长期贮存。

微型变态器官繁殖体不能过度脱水，但亦需要适当干燥，以除去表面及内部多余的水分，同时要进行表面消毒处理，以防止包被后的感染。为了延长贮存时间，需要根据使用季节进行适当的休眠处理。而以芽为繁殖体的类型，则不能进行脱水处理，但必须筛选生长健壮、组织充实的芽进行包埋。倪德祥等 (1994) 在安祖花和紫参不定芽人工种子的研究中认为，在分离不定芽进行包被之前应进行适当的预培养，以有利于芽的分离，从而避免在芽分离过程中的机械伤害，减少对繁殖体质量的影响。

二、繁殖体的包埋

使用一定的介质包埋繁殖体是人工种子制备的关键技术。包埋介质既要能对繁殖体起保护作用，又要对繁殖体没有毒害，同时还要求具有一定的缓冲强度，以保证繁殖体在生产、运输和种植操作中的安全。包埋介质中最好能够混合一定的营养成分，提供类似于胚乳的营养物质以供繁殖体发芽的需要。此外，由于繁殖体的含水量较高，贮存中极易受到微生物的感染危害。因此，介质中还应含有适当的杀菌剂。目前大多数研究者认为，海藻酸盐仍然是较为理想的人工种子包埋剂，因为它不仅无毒害，而且具有一定的保水和透气性能。常温下海藻酸钠 (2% ～4%，质量浓度) 呈液态，当有 Ca^{2+} 存在时即凝固成固态或半固态，因而便于包埋的操作。此外，还可使用琼脂、明胶等作为包埋剂。在进行繁殖体包埋时，为了提供类似于胚乳的营养成分，通常设计一定配方的人工胚乳液，然后用人工胚乳液配制海藻酸钠。常用的人工胚乳液配方有两种：MS (或 SH、White) 培养基加入 1.5%的马铃薯淀粉水解物；SH (0.5×) 培养基加入 1.5%的麦芽糖。除了基本成分外，根据繁殖体特性和具体要求，还可加入适宜浓度的激素、抗生素和杀菌剂等。表 8.5列出了几种植物人工种子的成苗情况，可以看出，在有人工营养的情况下，它们均具有较好的成苗能力。

通常以海藻酸钠作包埋介质的操作程序是：在配制好的海藻酸钠溶液中，按一定比例加入繁殖体并混匀，然后将其逐滴滴入 2.0% ～2.5%的 $CaCl_2$ 溶液中，经 20～30 min的离子交换作用，即能形成含有繁殖体并具有一定刚性的小球珠 (bead)，再用水漂洗 20 min以终止反应。此时的人工种子是一种胶囊状结构 (图 8.5)，将其晾干后可贮存或播种。目前，许多报道的人工种子制备大多通过这种方式包被。但由于胶囊之间在相互接触中易发生黏连，同时还容易很快失水而造成胶囊开裂，因此，近年来许多研究者试图通过在藻酸盐中加入其它成分来改良人工种子的失

水和养分流失状况,如活性炭、滑石粉和淀粉等,均有一定效果。但这些物质的加入通常又影响胶囊的韧性,因此,研究更好的包被介质仍然是人工种子研究的重要内容之一。此外,包埋过程中还应注意每一粒人工种子最好只含一个繁殖体,故要根据繁殖体的体积大小选择合适的滴管口径。对于有些体积较大的微型变态器官而言,人工胚乳并不是必不可少的,但需添加适宜的杀菌剂以防微生物感染。

表 8.5 几种植物人工种子的附加成分及成苗率

植物及繁殖体	海藻酸钠浓度/%	培养基及蔗糖浓度	激素和附加成分及其浓度/(mg/L)	成苗率/%
四会贡柑体细胞胚	3	MT,4%	GA (1), IBA (0.25)	30～70 (无菌)
唐菖蒲小球茎	4～5	MS,1.5%	IBA (0.5), GA (0.1)	93 (无菌)
热带兰花球茎	4	改良 MS	NAA (1.0), BA (0.2)	95 (无菌)
赤桉微芽	4	改良 SH	NAA (0.2～0.5)	80～90 (无菌)
小麦体细胞胚	6	1/4MS	GA (1), 防腐剂 (200), IAA (0.2), 活性炭	45 (有菌)

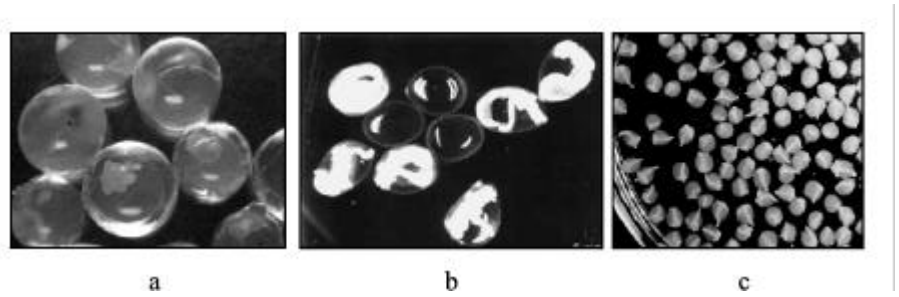


图 8.5 海藻盐包被的人工种子
a. 番木瓜体细胞胚人工种子 (Castillo等,1998);
b. 马铃薯微芽人工种子 (Patel等,2000);c. 人参体细胞胚人工种子 (Choi和 Jeong,2002)

海藻酸盐包被虽然操作简单,但如果大批量生产,人工操作的工作效率仍然很低,与其配套的批量化包被装置的研制是提高包被效率所必需的。Brandenberger和 Widmer设计了一个多喷头自动包被体系 (图 8.6),这一体系有 13个类似于滴管的喷头,改变其喷嘴的直径和脉动膜孔径即可用于不同大小的繁殖体以及细胞的包被,是一种比较方便的装置。

三、人工种皮的研制

自人工种子的概念提出以来,人工种皮的研制就成为研究的热点之一。早期的研究将人工种皮和包被介质视为一体,认为只要在繁殖体外包被一层介质或直接涂层即是人工种皮。但越来越多的研究表明,以海藻酸盐包被的繁殖体事实上是一种半固态的胶囊,贮存过程中的黏连、失水干裂等常常会影响人工种子的质量。而以其它材料如硅胶、壳多糖、树脂等直接包被繁殖体又易在表面形成硬壳而影响繁殖体正常呼吸。因此,近年来的研究将包被介质和人工种皮分成两个相互联系而又相对独立的部分。一般是采用人工营养液配制藻酸盐包被繁殖体形成胶囊。此时,包被在繁殖体外的藻酸盐凝胶由于含有营养物质,事实上行使的是胚乳的功能。然后采用适宜的材料在胶囊外再包裹一层种皮或包衣,形成完整的人工种子。采用这种方法制备的人工种子不仅在结构上与天然种子相似,同时由于外层具有种皮,可以有效地防止凝胶失水和养分流

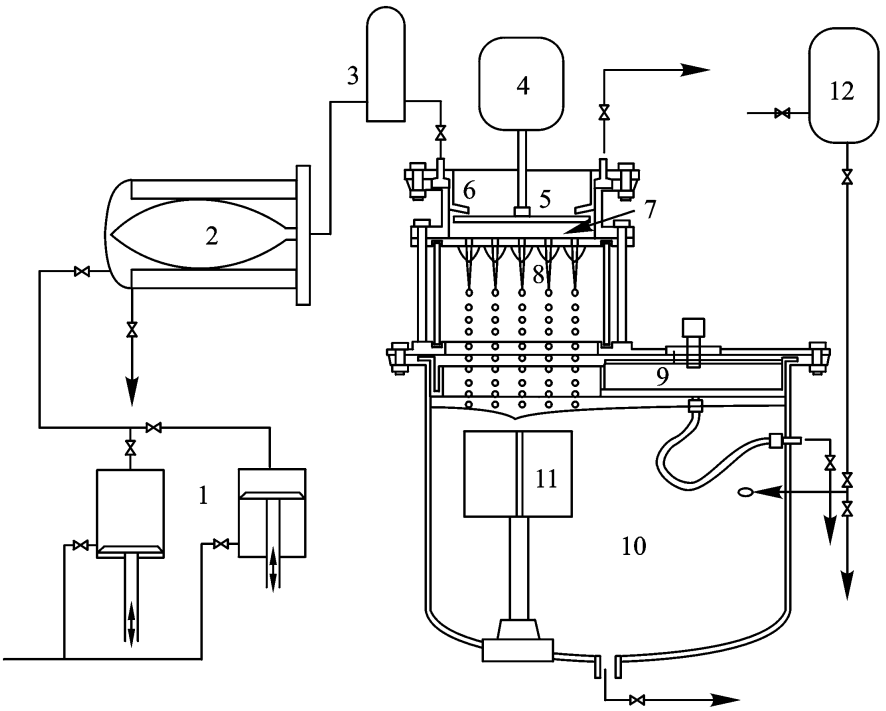


图 8.6　多喷头自动人工种子包被系统示意图
1. 双活塞泵；2. 灭菌器；3. 加湿器；4. 振动器；5. 脉动腔膜；6. 同轴沟；7. 脉动腔；8. 喷碟；9. 旁路系统；10. 反应池；11. 搅拌子；12. 硬化溶液及其输入
(引自 Brandenberger和 Widmer, 1998)

失。由于外层种皮通常有一定硬度,因而又增加了人工种子的耐挤压性,更便于贮藏运输。在种皮与繁殖体之间,由于有凝胶形成的胶囊保护,使繁殖体具有较好的发育空间,可以进行正常的呼吸代谢等生命活动,因此大大提高了繁殖体的生活力。

理想的人工种皮应该:具有一定的封闭性以保证人工胚乳的各种成分不易流失;具有良好的透气性,以保证繁殖体维持生理活性的需要;有一定的坚硬度,以加强人工种子的耐储运性和适于机械化操作;无毒无害,能保证繁殖体顺利穿透发芽。在满足这些要求的同时,还要求其具有配制简单易行,成本低等优点。严格地讲,迄今为止还没有一种公认的理想的人工种皮材料。早期一般使用一种 Elvax 4260树脂涂膜,然而并没有得到广泛应用,除了价格昂贵的因素外,操作复杂、包裹效果不尽人意也是重要原因。近年来,一些研究以藻酸盐为介质包被繁殖体后,再将胶囊置于脱乙酰壳多糖溶液中。由于脱乙酰壳多糖带正电荷,因此,藻酸盐和壳多糖之间发生复杂的聚合作用,从而在胶囊外形成一层有一定韧性的外壳种皮。选用这一途径制备的人工种子具有较好的贮藏性能和发芽率。Tay等 (1993) 采用这一方法包被胡萝卜体细胞胚,获得了发芽率 100% 的结果。他们的试验还显示,在这一包被体系中,如果先用脱乙酰壳多糖包被体细胞胚,再与藻酸盐溶液反应形成种皮,其发芽率很低,这也证明藻酸盐是目前适宜作为人工胚乳介质的良好材料。此外,新近试验使用的二氧化硅化合物材料,包括疏水的 Tullanox,微亲水的 Cab－O－Sil和硅酮种衣等,均可以粉末状包裹在人工种子胶囊外层,操作时只需将胶囊在上述材料中滚动即可完成包被过程,因此操作简单易行,大量生产还可以机械化操作,也是较好的人工种皮材料。随着材料科学的不断发展,相信将来会有更多、更适宜的材料作为人工种皮的选择。

第四节 人工种子的发展和应用前景

人工种子从根本上来说是植物离体快速繁殖技术的延伸和发展。与常规离体繁殖技术相比,除了有离体繁殖所具备的所有优势外,在应用上还有更多潜在的优点。首先,人工种子可以贮藏,因而可以周年生产,避免了试管苗应用中由于季节性生产而带来的诸多矛盾。其次,人工种子可以直接播种,减少了试管苗移栽在操作和管理上的困难,可以实现机械化操作和常规的田间管理。其三,由于人工种子可以长距离运输,因此,可以建立相对集中的大型生产企业,实现资源和技术优化。

然而,真正实现人工种子的实际应用,还取决于两个关键技术的成熟程度,即繁殖体生产技术和人工种皮材料的研制。从离体培养技术的角度上看,诸多植物的离体培养已经成功。但应用于生产实际的人工种子必须要有良好的性状一致性和遗传稳定性,而繁殖体离体培养中所出现的变异仍是人工种子应用的一个难题。尽管目前已试验过许多人工种皮材料,但离实际应用的要求也还有一定距离,因此,人工胚乳及人工种皮材料的研制,仍是人工种子研究的重要课题。此外,人工种子的贮藏技术也是目前还没有完全解决的问题。相信随着研究的深入,人工种子将会在更多植物中得以应用,并促使细胞工程技术在植物生产产业中发挥更大的作用。

一、微器官人工种子可能最先用于无性繁殖植物

多年来所进行的大量比较试验表明,微器官如微芽、试管块茎和试管鳞茎等作为繁殖体时,成苗率高且出苗整齐一致,具有田间应用的可行性。同时,在离体培养中,可采用脱毒技术首先除去病毒后再进行人工种子生产,这样能大大提高无性繁殖植物种子的质量,避免天然种苗引起的病害传播。正因为如此,目前利用组织培养脱毒生产的种苗已越来越多地用于无性繁殖植物的生产中。但传统上的试管苗由于不能贮藏、运输不便、对栽培管理条件要求苛刻,因而限制了其使用规模。如果利用人工种子技术,则可解决这些问题,从而可以加速无性繁殖植物种子生产技术的改良。目前,人工种子的实用化已在少数经济作物中开始进行,如香蕉微芽人工种子、桉树微芽人工种子、马铃薯试管块茎人工种子等。由于马铃薯试管块茎种子可以不经过包被直接应用,如能突破规模化生产技术,即可广泛应用,因此,规模化生产技术是其应用的关键和研究热点。目前,美国、日本等均建立了在液体发酵罐中生产马铃薯试管块茎的技术,试图通过人工种子途径替代传统的马铃薯种薯,但因其生产成本高,目前还没能直接用于生产。我们实验室根据我国实际情况研究出的试管块茎生产技术,可在每平方米的实验室空间年生产供 50亩地田间种植的试管块茎,且成本可与常规种薯相当,目前,这一技术已引起国内外广泛关注并已进入较大规模的示范阶段。如果试管块茎直接用于田间生产,它不仅可以解决长期困扰马铃薯生产的病毒病害问题,而且也为以变态器官为繁殖体的无性繁殖植物提供了人工种子利用的模式。此外,以微芽为繁殖体的人工种子技术有可能首先在无性繁殖的果树、花卉、林木等植物中得以应用。

二、人工种子可用于天然种子繁殖后代群体变异大的植物

许多木本植物如桉树、杨树等虽然能够用天然种子繁殖,但种子繁殖的植株群体变异大,树

体不整齐。不定芽试管苗繁殖技术已在生产上显示了树体整齐的优越性,目前以微芽为繁殖体的人工种子技术已经建立,可大大降低生产成本,减少运输损耗。桉树人工种子在土壤中的成苗率已可达 80%以上,且树体十分整齐。此外,一些药用植物现在大多处于半栽培条件下,种子繁殖不仅使植物学性状分离严重,同时药用成分也不一致,对现代医药的标准化生产极为不利。近年来,对药用植物的栽培生产开始提倡使用无性繁殖,从而也促进了药用植物人工种子的研究。人参体细胞胚人工种子在韩国已进入实用化研究。我国在半夏、地黄等药用植物的无性繁殖研究中也取得了突破性进展。薛建平等 (2003) 已在地黄、半夏研究中实现了试管根茎、块茎的高频率诱导,规模化生产技术也正在试验之中。

三、以体细胞胚为繁殖体应用的可能性及需要注意的问题

体细胞胚胎发生在多种作物中已进行过深入研究,然而迄今仍未达到实际应用的程度。除了群体的遗传变异外,生理上的不一致性也限制了它的利用。因此,利用体细胞胚为繁殖体需要根据不同的情况区别对待。如以花或果实为经济产品的多年生植物如果树等,体细胞胚人工种子有可能出现较长的幼年期,使开花结果推迟,且还可能出现果实不整齐的现象。Rival等 (1997) 在油棕体细胞胚植株大田生长中发现,大约有 5%的植株花器不正常,表现出雄蕊雌性化和完全不育。同时,油棕的体细胞胚人工种子还出现其它一些植株变异,影响了经济性状,因而不能在生产上使用。但在以营养器官或木材为产品的植物和以改善生态环境、保护濒危树种或对性状一致性要求不严格的植物中,体细胞胚繁殖体则具有其它繁殖体不可替代的优越性。但需要注意选择那些综合性状好的个体作为外植体来源用于起始培养,以便在大批量生产中获得相对整齐的优良群体。

尽管到目前为止,体细胞人工种子技术还不完全成熟,但它在生物学和社会经济发展中的潜在利用价值是不容否定的。任何新技术均需一定时间的研究、完善和发展,人工种子的应用也必须经历这些过程。随着人工种子生产技术的不断完善,人工种子也将在不同植物中得以应用。

思考题

1. 人工种子的概念和类型。
2. 人工种子对繁殖体有什么特殊要求?
3. 目前人工种子生产中需要研究解决的主要技术问题。
4. 目前人工种子最适于在哪些方面应用?

第九章

植物种质资源离体超低温保存

第一节　概　　述

一、植物种质资源低温保存的重要性

植物种质资源是物种进化和植物遗传育种研究的物质基础，也是人类赖以生存和持续发展的基本条件之一。由于自然和人为因素的干扰，许多植物栽培品种和野生资源正受到严重影响，一些珍稀植物已经灭绝或濒临灭绝，因此，植物种质资源的保存已成为全球性关注的课题。

传统的种质资源保存以种子保存方式为主，这是因为种子保存节约空间，保存期较长，而且种子易于干燥、包装和运输。种子在低温下长期保存是防止良种衰变的一条重要途径（陈叔平，1995）。但是，种子的保存有其局限性和特殊性。随着贮存时间的延长，种子的生活力逐渐下降。同时，贮存的种子常受到病虫鼠害的侵袭，造成资源丢失。

种子通常分为非顽拗型种子（orthodox seeds）与顽拗型种子（recalcitrant seeds），其中顽拗型种子含水量高，不能忍受干燥，仅能存活几周或几个月，很难长期保存（Bonner, 1995）。

此外，在农作物中有不少种类是依靠营养器官繁殖的，如薯蓣、大蒜和百合等，大多数果树也不能通过种子将优良性状稳定地遗传给后代，而是依靠扦插和嫁接等无性繁殖方式繁衍。还有些一年生的作物如马铃薯、甘薯等，多数以传统的方式留种，其营养繁殖器官不能长期保存，而且这些营养繁殖体还会因病毒的感染而引起品种退化和变异。

建立种质资源圃是一些植物种质资源保存常用的方法。但这种保存方式必须种植需要保存的植物，占地面积大，投入的人力和物力多，管理费用较高，保存期限较短。而且资源圃种植的植物资源还容易受自然灾害和病虫害的影响，造成资源损失。在目前经济高速发展、土地资源紧张的情况下，这种传统的种质保存方式已不能适应现代化发展的需要。

随着生物技术的日益发展，人们已获得一些具有优良特性的无性系、特殊用途的细胞系以及其它遗传材料，传统的方法已无法对其保存，这些种质资源需要用新方法进行保存。离体保存技术正是在这种需求中发展起来的。随着离体培养技术基础研究的迅速发展，组织和细胞培养技术为植物种质资源的保存开辟了新途径。目前，通过低温培养对离体材料进行继代保存，是种质资源中期保存的常用方法。一些耐寒植物可以在 0～5℃下保存（Durart, 1985），而一些亚热带植物可在 10℃左右保存（Staritsky等，1986），热带植物则通常在 15℃以上保存（Corbineau等，1990）。然而，这种迫使植物缓慢生长的方法仍需要定期继代，在添加培养基或更换培养基时容易造成污染。

近年来，植物材料的超低温保存技术得到迅速的发展和完善。大量研究已经证明，植物离体

材料经超低温保存后,仍能在适宜的条件下迅速大量繁殖,再生出新的植株,并保持原来的遗传特性。Moukadiri等(1999)研究表明,超低温保存对水稻愈伤组织再生后代的表型特征没有影响。Butenko等(1984)、Withers等(1987)和Shibli等(1999)的试验也证明,保存后的愈伤组织具有正常的分化能力。同工酶谱分析表明,甜橙体胚(Marin等,1993)、甘蔗分生组织(Paulet等,1994)材料经保存后,谱带没有发生变化。应用分子标记RFLP分析甘蔗再生植株,也未发现图谱变化(Chowdhury等,1993)。目前已有多种植物材料被用于超低温保存研究,且获得良好的保存效果。组织培养物的超低温保存可以节约大量的人力、物力和土地,克服长期继代培养导致的再生能力丧失,也便于国际间种质资源的交流。因而,植物离体材料超低温保存是长期保存种质资源的理想方法。

二、超低温保存的概念

种质资源低温保存(cryopreservation)是由cryo和preservation组成,在英语中cryo为一前缀,被解释为低温、冷、冰和霜之意。从词义看,低温所涉及的温度范围是不确定的。习惯上,人们将-80℃以下的低温称为超低温,干冰温度(-70℃)称为极低温,低温则从4℃往下推(李广武等,1998)。对植物而言,低温常常是指那些比常温稍低一些的温度。如果低温超过细胞原生质所能忍受的临界温度,就会致使植物细胞遭受冻害而死亡。如甜橙树发生冻害的临界温度通常在-6.5℃,枳壳通常在-20℃左右(沈德绪等,1986)。

植物种质资源的超低温保存通常采用比植物遭受冻害的临界温度低得多的超低温条件。当恢复到常温后,植物仍能进行正常的生命活动,但这需要特殊的冰冻保护处理,控制降温和冰冻速度,选择适当的化冻方式,才能达到这一目的。

超低温通常是指-80℃以下的低温。常用的保存介质或容器有:超低温冰箱(-80~-150℃)、液氮(-196℃)和液氮蒸汽相(-140℃液氮)等。在这种温度下,活细胞内的物质代谢和生命活动几乎完全停止。因此,细胞、组织和器官在超低温保存过程中不会引起遗传性状的改变,也不会丢失形态发生的潜能。

目前常用的超低温保存方法可分为两类,即冷冻诱导保护性脱水的超低温保存和玻璃化处理的超低温保存。在超低温条件下,生物的代谢和衰老过程大大减慢,甚至完全停止,因此可以长期保存植物材料。

三、超低温保存的研究概况

1. 超低温保存技术的发展

自1949年Polge等人发现甘油可保护精子免受冰冻伤害以来,超低温开始广泛应用于动、植物细胞、组织和器官的保存,并取得很大的进展。早期的超低温保存大多采用冻结化保存技术,如快速冰冻法和慢速冰冻法(孙敬三等,1995)。许多植物细胞类型已用于保存研究,但在实际操作中,只有少数程序具有实际应用价值,这是因为多数保存程序只适合于悬浮细胞或愈伤组织这些同质均一的细胞材料,而对已分化的、多细胞类型组成的组织和器官,如茎尖、合子胚的保存则不适用。

直到20世纪80年代后期,玻璃化法迅速发展起来,才较好地克服了传统降温程序对材料类型的限制。至今,通过超低温保存的植物材料已达百余种。所用的材料包括悬浮细胞、愈伤组

织、花粉、合子胚、体细胞胚、胚和胚轴以及茎尖分生组织等。

2. 用于离体超低温保存的植物材料

用于离体超低温保存的植物材料一般有愈伤组织、悬浮细胞、胚、花粉和茎尖等。

愈伤组织和悬浮细胞是体细胞胚及再生植株的重要来源。愈伤组织和悬浮细胞的超低温保存多采用两步法。两步法是所有超低温保存方法中研究得最为系统的一种,其技术路线较为成熟。现在,愈伤组织和悬浮细胞的保存也开始使用玻璃化保存方法,其保存效果更好(Moukadiri等,1999;Joshit等,2000)。

植物胚常以体细胞胚、性细胞胚和合子胚3种形式存在。随着离体培养技术研究的深入,许多植物能大量同步地诱导形成胚状体,用于植株再生研究和人工种子制备。体细胞胚超低温保存是合子胚超低温保存的有力补充。印度学者Bajaj(1987)首先将胡萝卜体细胞胚状体和烟草胚状体超低温保存成功,并获得再生植株。Pérez等(1997)对柑橘胚性愈伤组织进行超低温保存,以10% DMSO为冰冻保护剂,采用慢速降温,在液氮中保存2年,经快速解冻,4个柑橘品种均能获得完整植株。Ford等(2000)将松树的体细胞胚用0.3 mol/L山梨醇(sorbitol)和5% DMSO作为冰冻保护剂,超低温保存8周后,可以诱导正常的再生植株。

植物花粉是一种重要的植物种质材料,但植物花粉寿命通常很短,因此贮存花粉具有重要的现实意义。在杂交育种中,贮存花粉可解决开花迟的植株对开花早的植株授粉困难的问题。由于花粉不易发生病毒和真菌孢子感染,而且花粉通过空运、邮寄可节省时间,加速育种进程,因此,花粉是国家或地区之间种质交换的重要材料。目前,对花粉保存技术的研究已涉及农作物、木本植物、果树和药用植物等。据统计,已有柑橘、柿、胡桃、鳄梨、海枣、李、梨、雪松、扁柏、落叶松、杜鹃花和秤锤树等植物花粉被进行了低温保存研究。张连学等(1993)研究了珍稀的药用植物人参和西洋参的花粉的超低温保存,花粉保存后的萌发率和存活率与新鲜的花粉无明显差别。

采用玻璃化法特别有利于体积较大的块状材料的保存(汪君晖等,1994)。茎尖分生组织作为超低温保存材料具有某些独特的优点。从茎尖分生组织不仅可以直接再生完整植株和进行快速大量的无性繁殖,并且减少了材料的遗传变异。玻璃化法已在大蒜、马铃薯、甘薯、芦笋、芋头、冬葱、百合、陆生兰、麝香石竹、菊花、薄荷、豆荚树、石刁柏、山嵛菜、白苜蓿、苹果和梨、菠萝、番木瓜、茶和桑树等茎尖保存中均获得较好的效果。

3. 超低温保存的植物种类

超低温保存已涉及到不同的植物种类,如野生及人工创造的谷类、豆类、薯类、油类、糖类、纤维类、蔬菜类、果树、树木、药用植物和藻类等。

野生稻资源是稻种资源的重要组成部分,占稻属的91%。它是天然的基因库,保存了栽培稻没有的或已消失了的基因,并具有特殊的优良性状及高抗病虫害的特性。殷晓辉等(1996)对不同基因组的野生稻愈伤组织进行超低温保存,结果冻后细胞存活率最高达87.9%。经超低温保存后还获得了普通野生稻、宽叶野生稻和疣粒野生稻的再生植株。

有关藻类种质的超低温保存研究从20世纪60年代就已经开始,较多的工作是在20世纪70年代~20世纪80年代期间完成的。近10年来,藻类冰冻保存的研究主要集中在有经济价值的藻类,如微藻类及大型藻类等。目前已对400余属数千种的淡水和海水藻类进行过冰冻保存(汪起华等,2002),有的微藻保存已长达10~20年以上(Day等,1997)。

据统计,已有40多个属60多个种的木本植物进行了超低温保存试验,其中大多数是20世

纪 90年代报道的。种子、胚、胚轴和体胚的保存常用干冻法,茎尖和分生组织的保存大多用玻璃化法或包埋脱水法,愈伤组织和悬浮细胞的保存大多用两步法。近 30个属共 40多个种的木本植物进行了种子、胚、胚轴或体胚的超低温保存研究 (汪君晖等,1998)。

大多数果树由于自身的遗传特点,不适于用种子保存,离体保存因此成为果树种质资源保存的重要替代技术。离体培养技术已经用于多种果树如苹果、柑橘、梨、猕猴桃、葡萄、李属砧木、香蕉、柿子和草莓等资源的短期或中期保存,但仍需定期地进行继代培养,并且多次继代可能导致材料产生遗传变异。超低温保存是不需要继代的长期保存方法,能对多种外植体进行保存,如柑橘的悬浮细胞 (Kobayashi等,1997)和胚轴 (Radhamani等,1992),葡萄和猕猴桃的愈伤组织 (Moriiguchi等,1988;郭延平等,1996),板栗的胚状体 (Jekkel等,1998),香蕉 (Panis等,1996)、苹果、梨 (Scottez等,1992)和桃 (Reed等,1990)的茎尖等,多采用冷冻脱水的保存技术。随着玻璃化法的发展和完善,许多重要的果树资源的保存技术已在实际工作中得到广泛应用。

在液氮的超低温贮藏中,植物材料不仅能长期保持形态发育的潜能,还能保持遗传性状的稳定。超低温保存适用于对植物材料进行短、中、长期保存,更是唯一的、不需要继代的、可靠的长期保存方法。随着保存技术的发展,运用复合程序的超低温保存技术不断涌现,对一些体积较大的组织进行保存将成为可能,且保存过程对材料的伤害越来越小。因此,超低温保存技术为种质资源保存提供了一条新的途径。

第二节　植物材料超低温冻存的细胞学基础

到目前为止,进行过超低温保存的植物材料已达百余种,无论哪种植物材料的保存,研究的对象都是以细胞为基础的。因此植物材料的冻结,首先是细胞冻结问题,是离体超低温保存首先必须研究的生物学现象。

一、细胞内外水的冻结状态是细胞冻存技术的关键

细胞的冻结实际上是指细胞内外水的冻结。植物细胞中含有大量的水分,约占细胞总重量的 60% ~90%。细胞中的水是由游离水和束缚水组成,其中游离水约占 90%,很容易冻结。由于细胞内含有复杂的化合物,细胞内的溶液并不像纯水那样在 0℃左右结冰。

理论上讲,细胞外水的冻结温度为 -5~-15℃,细胞内游离水的冻结在 -25℃。 -30℃时,细胞几乎没有非冻结状态的游离水存在,而结合水在 -100℃温度下也不冻结。根据 Luyet的冻结理论 (Luyet,1937),细胞游离水的冻结温度 (-30℃)可被认为是细胞冻存的安全温度,因而细胞冻存的两步冻结法是以 -30℃为基础的。但事实上,细胞冻存的检测结果并非如此,即便是在 -70℃以上,细胞内某些酶类仍具有一定的活性,细胞仍可以进行简单、缓慢的代谢,冻存细胞也不能达到长期保存的目的。只有在 -196℃的超低温下,细胞的冻存才是安全、可靠的 (李广武等,1997)。

控制细胞内外水的冻结状态是细胞冻存技术的关键。在生活细胞的胞内冻结之前发生的是胞外冻结。细胞悬浮在常规浓度的冰冻保护剂中,适宜的方法是采用两步降温冷冻法或慢速降温冷却法,因为适度的细胞内脱水对冻存是有益的。快速降温容易使细胞内过早结冰或冻结,对

细胞有破坏作用,造成细胞结构的破坏。但玻璃化冻存技术例外,玻璃化冻存除了要提高保护剂浓度外,还需加快降温速度,使细胞内水冻结冰晶体积非常小,出现玻璃状的冻结现象,这样才能使细胞免受伤害,达到细胞冻存的目的。可见,掌握植物细胞内外水的冻结规律,避免冻结可能造成的损伤十分重要。

二、植物细胞超低温保存过程中的致死损伤

细胞超低温保存有 3个重要操作步骤:一是细胞预冻;二是细胞在 -196℃下长期贮存;三是细胞解冻。通常细胞在 -196℃下贮存是安全的,而在预冻和解冻期间发生致死损伤的可能性更大。由于采用非标准的冻存程序,会造成细胞膜系统的完整性损伤,亚细胞结构遭受破坏和代谢酶失活,细胞结构与功能受到严重损害,致使冻融的细胞难以恢复生长而死亡。这种损伤是可以通过完善和改进技术程序加以避免的。

植物超低温保存技术建立在生物细胞冻害和抗冻机理的基础之上。在降温冰冻过程中,如果生物细胞内的水发生结冰,就会造成细胞结构不可逆性的破坏,导致死亡。因此,种质超低温保存成功的关键是降温冰冻过程中避免细胞内结冰。在降温过程中必须使细胞发生适当程度的保护性脱水,使细胞内的水流到细胞外结冰,并且在化冻过程中防止细胞内次生结冰。为此,针对不同种类的植物材料,筛选适合的冰冻保护剂,采用适当的降温冰冻速度和化冻方式,可能使细胞不受损伤或使损伤减小到最低程度。

第三节 超低温保存的方法

超低温保存植物种质资源的程序包括培养材料的准备、预处理、冰冻及保存、化冻处理、细胞活力和变异的评价及植株再生等几个步骤,其中最重要的是如何进行降温和冰冻处理。

Sakai (1990) 首次成功地对低温锻炼后的桑树小枝条进行了超低温保存,枝条在低温锻炼过程中,虽然积累的有机物质能对枝条保存有利,但低温锻炼导致的保护性脱水才是保存成功的主要原因。

保护性脱水最早用于种质资源的超低温保存,其过程是将材料缓慢地冷却到一定的温度(如 -40℃)。随着温度的降低,细胞内、外介质首先过冷却,随后细胞外介质结冰,形成细胞内外的蒸汽压差,导致细胞通过向外部失水达到平衡。只要降温速度不阻断脱水的连续性,细胞内的水分就能不断地扩散出来,使原生质体浓缩。在最佳条件下,大部分或全部自由水被移走,减轻或避免了样品浸入液氮时发生的细胞内结冰。

一、传统的降温冰冻方法

在 20世纪 80年代,主要是利用保护性脱水进行超低温保存。保存程序包括 :材料选择与预培养、冰冻保护剂处理、两步法冷却、液氮保存、迅速化冻和恢复生长。由于降温冰冻方法是影响超低温保存效果的关键因素之一,所以它在超低温保存技术体系中一直是研究的重点。从降温方式来看,有快速冰冻法、慢速冰冻法、两步冰冻法和逐级冰冻法等几种。

1. 快速冰冻法

该方法是将材料从 0℃,或者其它预处理温度直接投入液氮。其降温速度在每分钟1 000℃以上。高度脱水的植物材料,如种子、花粉、球茎和块根,以及抗寒性较强的木本植物的枝条或芽,经过冬季的低温锻炼都可以采用快速冰冻法。

2. 慢速冰冻法

一些包含大液泡和大量水分的成熟植物材料一般不适宜采用快速冰冻法,而适宜用冰冻保护剂处理,然后采用慢速冰冻法。以每分钟 0.1～10℃的降温速度从 0℃降到 −70℃,接着浸入液氮。这样可以使细胞内的水有充足的时间流到细胞外结冰,从而使细胞内的水减少到最低限度,避免细胞内结冰。此方法需要配备程序降温器。

3. 两步法

样品在添加冰冻保护剂后,用可控速率的降温设备(程序降温仪),以某个速率(一般在每分钟降 0.1～0.5℃之间),将样品降温至转移温度(一般为 −40～−70℃),然后投入液氮贮存。冰冻保护剂成分、降温速率和转移温度等因素将影响冻存的效果。

4. 逐级冰冻法

该方法需要准备不同温度的冰浴,如 −10℃, −15℃, −23℃和 −40℃等。材料经保护剂在 0℃预处理后,依次经过这些温度处理,每级约停留 5 min,然后浸入液氮。简成令等(1987)将甘蔗愈伤组织在 0℃的冰冻保护剂(10% DMSO+0.5 mol/L 山梨醇)中预处理 30～45 min,接着以 1℃/min的降温速度从 0℃降到 −40℃,停留 1～3 h,投入液氮中保存,半年后仍可再生大量植株。

利用保护性脱水进行超低温保存,在一些植物上仍然是十分有效的保存方法。Brison等(1995)用两步法保存两个桃砧木品种离体培养的茎尖,再生率达到 69%和 74%。殷晓晖等(1996)研究了野生稻愈伤组织超低温保存方法,选取继代培养 14 d处于迅速生长期的愈伤组织块(2～3 mm)放入 2 ml安瓶中,在冰浴条件下逐步加入冰冻保护剂(各种冰冻保护剂均溶于1/2 MS培养基中),冰冻保护剂与材料体积比为 1∶1,然后于冰桶中预处理 45～60 min,材料以1℃/min的速度从 0℃降到 −10℃并保持 15 min,然后又以 1℃/min的速度降到 −40℃,保持60 min,接着投入液氮中。将在液氮中保存的材料取出后投入 40℃水浴中快速解冻,然后用MS+3%蔗糖培养液洗涤 3次,每次停留不超过 10 min,冷冻后细胞成活达 87.9%。经过低温保存的愈伤组织化冻后,接种于继代培养基上进行暗培养,再把恢复生长的材料转入分化培养基中于 26℃光照条件下培养 30 d后分化出绿苗。

二、玻璃化保存方法

玻璃化(vitrification)是指液体转变为非晶体(玻璃态)的固化过程。早在 1937年,Luyet就提出了用玻璃化方法作为冰冻保存生物体的途径。玻璃化比冻结固化方法引起的结构变化要小,因而是一种较理想的低温保存方法。

使溶液玻璃化有两条途径:一是大幅度提高冷却速率;二是增加溶液浓度。当抗冻剂溶液(如甘油、DMSO、丙二醇等)的质量浓度为 40%～60%时,较容易形成玻璃态。但在室温下,这样高的浓度会对细胞产生剧烈的损伤。

自从 1981年 Fahy提出采用高浓度的冰冻保护剂溶液、以较慢的冷却速率以及在高压条件下实现玻璃化以来,许多玻璃化低温保存研究工作都集中在寻求容易实现玻璃化并且对细胞损

害较小的溶液方面。

事实上,大部分冰冻保护剂都可以作为玻璃化溶液。对于许多生物系统来说,生物体在40%～60%渗透性保护剂条件下会产生毒性损伤。将各种保护剂混合使用,可降低浓度、减小毒性。将1,2-丙二醇加入到甘油、乙二醇以及DMSO中,可以使后者的浓度分别降低,使玻璃化形成的能力增强,同时不产生毒性效应使单独使用时的毒性得到部分中和与抵消。

1986年,Fahy研究了另一种有效的玻璃化溶液(PVS1),其中包含了20.5%(质量浓度)的DMSO、15.5%的乙酰胺、10%的1,2-丙二醇以及6%的聚乙二醇,它们分别起到冰冻保护、毒性中和、强化玻璃化和非渗透聚合的作用。

20世纪80年代末至90年代初,玻璃化法和包埋脱水开始应用于植物材料的超低温保存。与冷冻脱水的超低温保存法相比,玻璃化保存技术具有很大的优越性。玻璃化法不需要昂贵的程序降温仪,操作简单。同时,在冷冻过程中玻璃化避免了冰晶形成。该方法更适用于茎尖、合子胚等复杂器官,这些器官中包含有多种细胞类型,每种类型都需要特定的冷冻脱水条件,不容易用经典法成功保存。玻璃化法只需稍做改动,就能应用于多种外植体材料。目前,在具体操作中玻璃化的超低温保存方法主要有:玻璃化法和包埋玻璃化法(encapsulation-vitrification)。

1. 玻璃化法

玻璃化法是将生物材料经极高浓度的玻璃化溶液快速脱水后直接投入液氮,使生物材料连同玻璃化溶液发生玻璃化转变,进入玻璃态。此间水分子没有发生重排,不形成冰晶,也不产生结构和体积的改变,因而不会对材料造成伤害。保存终止后,复温时要快速化冻,防止去玻璃化的发生。材料能安全度过冷却和化冻两个关口,就可保证冻存的成功。

Langis等(1989)最先报道,玻璃化法可用于细胞悬浮系、顶端分生组织、胚状体和原生质体等多种外植体的超低温保存。

Ishikawa等(1997)将兰花胚状体接种在附加0.3mol/L甘油和0.4mol/L蔗糖的Dogashima(ND)培养基上,在25℃条件下处理15min,然后用PVS2玻璃化溶液,在0℃条件下处理3h后投入液氮。兰花胚状体迅速解冻后,用1.2mol/L蔗糖溶液洗涤20min,这样玻璃化保存的胚状体转入ND培养基上进一步培养,有60%胚状体能再生植株。

芋头离体培养茎尖在含0.3mol/L蔗糖的MS培养基上预培养16h(25℃),用2mol/L甘油和0.4mol/L蔗糖溶液装载处理20min,然后茎尖在PVS2玻璃化溶液中脱水20min(25℃),解冻后7d,80%的茎尖可恢复生长(Takagi等,1997)。

Vandenbussche等(2000)进行了甜菜茎尖玻璃化保存试验。切取茎尖在含0.3mol/L蔗糖的DG10固体培养基上预培养1d(5℃),在含2mol/L甘油+0.4mol/L蔗糖溶液中装载20min(20℃),投入液氮保存。解冻后茎尖在含1.2mol/L蔗糖(20℃)和DG10培养基中去装载处理15min,茎尖成活率达到60%～100%之间。

Lambardi等(2000)成功地用一步玻璃化法冻存了白杨离体培养的茎尖。首先将茎尖接种在不含激素的MS培养基上预培养2d(5℃),在2mol/L的甘油+0.4mol/L的蔗糖中保持20min,接着用玻璃化溶液PVS2处理茎尖60min(0℃),直接投入液氮。在40℃条件下解冻,并用1.2mol/L蔗糖溶液洗20min,最高成活率达90%,超低温保存后60%的茎尖能诱导产生完整植株。

Matsumoto等(2001)对柿子茎尖用玻璃化溶液处理20min(25℃),再投入液氮保存,然后

在 40℃水浴中迅速解冻，进一步培养，3周后产生芽，芽形成率达 89%。

2. 包埋玻璃化法

包埋玻璃化法是包埋－脱水法和玻璃化法的结合。Tannoury等（1991）首次报道了用包埋玻璃化法保存香石竹顶端分生组织。保存材料先用藻酸钙包埋，然后经蔗糖浓度梯度脱水和玻璃化溶液处理后直接浸入液氮保存，其材料存活率比用包埋－脱水法要高，可能是藻酸钙包埋后减轻了玻璃化溶液的毒性。Hirai等（1999）将离体培养的薄荷腋芽分生组织在 4℃条件下保持 3周，用 2mol/L甘油和 0.4 mol/L蔗糖的藻酸钙包埋，分生组织用高浓度的玻璃化保护液（PVS2）在 0℃条件下处理 3 h，然后投入液氮中，解冻后芽诱导率达 90%。在唇形科植物上试验证明，包埋玻璃化的分生组织比包埋脱水的分生组织效果更好。

Phunchindawan等（1997）对山葵茎尖原基诱导的发根培养物进行了两种方法的超低温保存试验。包埋的茎尖原基在附加 0.5mol/L蔗糖的 MS培养基上培养 1 d，然后用高浓度玻璃化溶液 PVS2处理 4 h（0℃），投入液氮，被包埋的茎尖原基成活率达 69%。当包埋的茎尖原基在含有 0.5mol/L蔗糖和 1mol/L或 1.5mol/L甘油中预培养，诱导脱水 1 d，接着进行空气干燥，再投入液氮中保存，茎尖原基成活率超过 90%，且解冻 2周后可产生芽。

三、其它超低温冻存方法

在传统的低温保存技术的基础之上，针对不同植物材料的特点，又衍生出一些针对性更强、综合性更强的超低温保存方法，如干燥法（desiccation）、预培养法（pregrowth）、预培养－干燥法（pregrowth－desiccation）和包埋脱水法（encapsulation－dehydration）。

1. 干燥法

干燥法是利用无菌空气流、干燥硅胶饱和溶液表面的气相等对样品进行脱水，然后快速将样品投入液氮贮存。这种方法程序简单，主要应用于植物的合子胚或胚轴的冻存，也就是将合子胚或胚轴在空气或硅胶中干燥后直接浸入液氮。枳壳的胚轴用硅胶干燥后浸入液氮冻存，恢复生长后可获得 68%的成活率。Radhamani等（1988）报道，不带子叶的枳壳胚轴能忍受脱水至 14%，在液氮中保存 8个月后能萌发。Dumet（1994）和 Engelmann（1995）对龙眼、荔枝和芒果的胚轴进行硅胶干燥处理，可以获得缓慢而稳定的脱水速度，使组织能逐渐适应水分胁迫，效果较好。

2. 预培养法

预培养法是将保存材料在含有冰冻保护剂的培养基上预培养一段时间，以诱导脱水。然后，将脱水材料浸入液氮进行保存。该方法主要用于合子胚和顶端分生组织的保存。现在常将材料接种在高浓度蔗糖培养基中进行预培养。Panis等（1996）将香蕉茎尖培养物经高浓度蔗糖（0.5mol/L）培养基中进行预培养 2～4周，直接投入液氮中保存 1 h，存活率达 72%。Schnabel－Preikstas等（1992）对马铃薯茎尖进行高浓度蔗糖预培养，Niino等（1992）在苹果和梨茎尖进行高浓度蔗糖预培养，均获得较好的保存效果。在含有聚乙二醇和二甲基亚砜的培养基中对材料进行预培养，也可以提高保存后的存活率。目前，这种方法被认为是长期保存香蕉种质资源的简单可行的方法。

3. 预培养－干燥法

这一方法是预培养法和干燥法结合的冻存方法。材料先在含冰冻保护剂的培养基上预培

养,并进行干燥,然后浸入液氮保存。有些研究者用高浓度盐溶液和压缩空气流处理,使要保存的材料脱水干燥。Ashmore (1997) 利用该技术已成功地保存了 80个油棕无性系的胚状体。

4. 包埋脱水法

包埋脱水法是在预培养和干燥法的基础上增加了一个包埋程序。此方法包括 3个步骤:先是将材料用藻酸钙包埋,然后将包埋后含有保存材料的藻酸钙小珠在含有高浓度 (或梯度浓度) 蔗糖的培养基上预培养,最后浸入液氮保存。材料包埋后再进行预培养和干燥,增强了材料对干燥脱水和骤冷的抗性,使一些含液泡的外植体也可以进行液氮保存。运用包埋脱水法常选用蔗糖作冰冻保护剂,并采用硅胶或无菌气流进行干燥。包埋脱水法最早产生于梨树茎尖的超低温保存 (Dereuddre等,1990)。赵艳华等 (1998) 和 Paul等 (2000) 曾成功地用包埋干燥超低温保存苹果离体茎尖,图 9.1为包埋脱水法超低温保存苹果茎尖示意图。

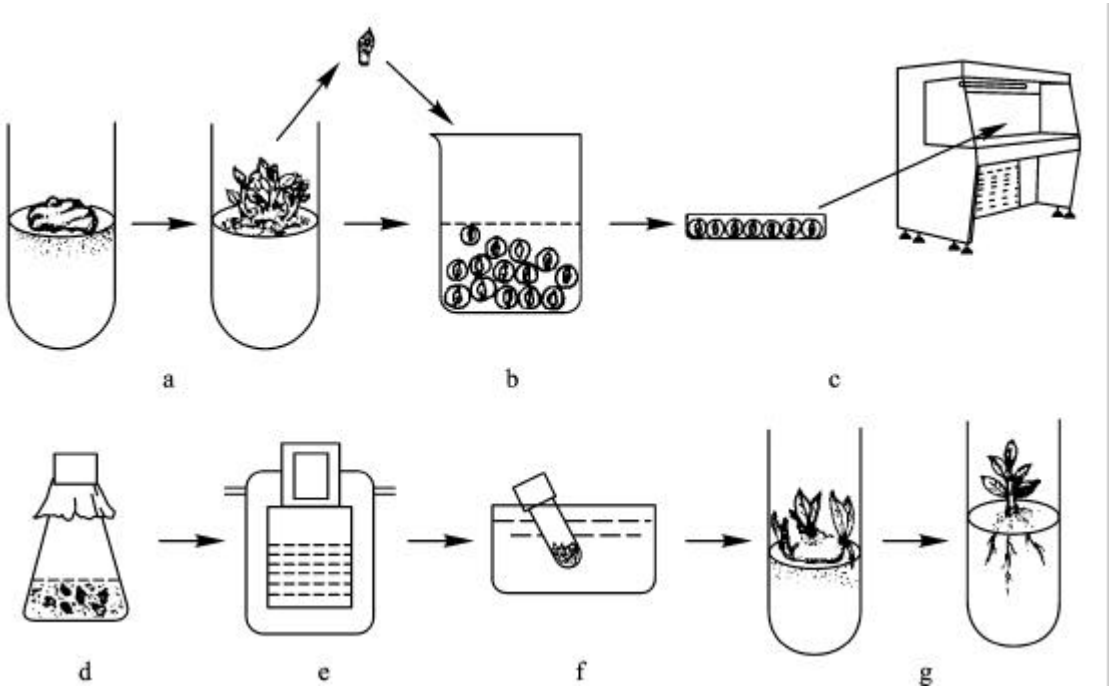


图 9.1 包埋脱水法超低温保存苹果茎尖示意图

a. 诱导茎尖并让茎尖培养物在黑暗 (4℃) 条件下低温锻炼;b. 茎尖分离后用藻酸钙 (alginategel) 包埋;c. 将茎尖置于培养皿中,在净化工作台上干燥处理;d. 被包埋的茎尖在含 0.75mol/L蔗糖的培养基上预培养;e. 茎尖置于冷藏管中,浸入液氮进行超低温保存;f. 化冻处理;g. 植株再生 (引自 Plau, 2000)

Shibli等 (2001) 报道了苜蓿细胞培养物的包埋脱水程序和生理变化。被包埋的细胞在含有 0.75mol/L蔗糖的 B5培养基中预培养 4 d,然后在层流箱中脱水 4 h后投入液氮。用 TTC法检测 5 929个保存的细胞,其中有 5 262个细胞具有活力。细胞在 2℃低温条件下锻炼 10 d,可以改进保存的效果。包埋后的苜蓿细胞在含有 0.75mol/L蔗糖的 B5培养基中预培养 4 d,蛋白质含量增加,蛋白质组成也发生变化。经过包埋脱水和液氮冻存的细胞需要继代培养 4~5次才能刺激其迅速生长。Martinez等 (1999) 研究了大麻茎尖的包埋干燥超低温保存技术。他们切下离体生长的茎尖,然后将茎尖在含有 0.5mol/L蔗糖的培养基及藻酸钙的溶液中包埋,再在含有 0.75mol/L蔗糖的培养基上预培养 2 d,接着在层流箱中硅胶脱水 4 h,投入液氮冻存 60min,解冻后茎尖有 80%的成活率,所获得的植株形态上无变化。目前应用玻璃化法和包埋脱水法保

存茎尖的植物见表 9.1。

表 9.1　玻璃化法和包埋脱水法保存植物茎尖文献一览表（1990—2002）

植物种类	参考文献
白花三叶草（Trifolium repens）	Yamada et al., 1991
甘薯（Ipomoea batatas）	Towill, 1992
日本百合（Lilium japonicum）	Matsumoto, 1995; Sakai & Matsumoto, 1996
菠萝（Ananas comosus）	Gonzalez-Arnao et al., 1998
薄荷（Mentha spicata L.）	Hirai et al., 1999
大叶茶（Camellia sinensis）	Kuranuki & Sakai, 1994
大麻（Humulus lupulus L.）	Martínez, 1999
大蒜（Allium sativum L.）	Niwata et al., 1998
豆荚树（Acacia mangium）	Sudarmonowati et al., 1998
番木瓜（Carica papaya）	Towill, 1990
甜菜（Beta vulgaris L. clone SES1）	Vandenbussche et al., 1998
枳（Poncirus trifoliata）	Gonzalez-Arnao et al., 1998
龙胆（Gentiana scabra Bunge var bucrgeri Maxim）	Sukai and Matsumoto, 1996
芦笋（Asparagus officinalis）	Uragami et al., 1990; Kohmura et al., 1992
陆生兰（Cymbidium spp）	Thinh et al., 1998
马铃薯（Solanum tuberosum）	Fabre & Dereuddre, 1990
猕猴桃（Actinidia deliciosa）	Suzuki et al., 1994
苜蓿（Medicago sativa L.）	Shibli et al., 2001
苹果（Matus domestica）	Niino et al., 1992; Niino & Sakai, 1992; Paul et al., 2000
葡萄（Vitis vinifera L. cv. chardonnay）	Plessa et al., 1994
桑树（Manihot esculenta）	Niino et al., 1992
山茱萸（Wasabia japonica）	Matsumono et al., 1994; Sakai & Matsumoto, 1996
麝香石竹（Dianthus caryophullus）	Langis et al., 1990; Towill 1990
柿（Diospyros kaki Thunb.）	Matsumoto et al., 2001
薯蓣（Dioscorea spp）	Mandal 1995
香蕉（Musa spp）	Helliot et al., 2002
杏（Prunus dulcis Mill）	Shatnawi et al., 1998
洋梨（Pyrus communis）	Dereuddre et al., 1990; Niino & Sakai, 1992; Niino et al., 1992
芋（Colocasia esculenta（L.） schott）	Takagi et al., 1997
甜菜（Beta vulgaris）	Kohmura et al., 1992

第四节　影响超低温保存效果的主要因素

一、材料的基本特性

材料的基本特性包括植物的基因型、抗冻性及器官、组织和细胞的年龄以及生理状态。不同基因型的植物离体材料对超低温冻存的反应各不相同。

植物细胞培养物的生长年龄是决定冻存后细胞成活率的最重要因素之一。指数生长期和滞

后期的幼龄细胞抗冻力强,存活率高。如杏愈伤组织超低温保存,在一定的继代次数范围内,随着继代次数的增加,保存后的成活率逐渐提高,继代 8次后达到最大值。对继代培养 4次分别生长不同天数的愈伤组织进行超低温保存,结果 15～20 d的愈伤组织超低温保存后成活率最高(马旺锋等,1999)。孙龙华等 (1989)研究了玉米和甘蔗的超低温保存,继代培养 10 d的玉米、甘蔗的愈伤组织超低温保存效果最好。胚状体的保存也与分化时期有密切的关系,经超低温保存后,幼龄球形胚的存活率最高,心形胚次之,子叶形胚最低。

Ryynanen等 (2001)研究了白桦树离体茎尖的超低温保存程序。用慢速降温法,以 PGD作为冷冻保护剂,从 20月龄的培养物上取茎尖比 55个月龄培养物上所取茎尖的保存效果要好。

适度干燥的花粉结合超低温保存可望成为一种永久性保存植物花粉的手段。对人参花粉超低温保存的试验证明,当花药含水量在 35.3%和 26.7%时,花粉保存后的萌发率和结实率与新鲜花粉的无明显差异(张连学等,1993)。

二、预培养和低温锻炼

预处理对于调整植物离体材料的生理状态非常有效。通过预处理的植物材料,减少了细胞内自由水的含量,使细胞能经受低温胁迫,减少或避免了冷冻伤害,可大大提高材料的抗冻力。

对于离体培养的植物,常在冻存前进行不同程度的预处理,可以提高抗冻力。预处理包括增加培养基中的糖浓度,提高渗透压,减少细胞内自由水的含量;在预培养基中添加诱导抗寒力的物质或冰冻保护剂,如 0.3～1.0 mol/L蔗糖、甘露醇和山梨醇等渗透压调节剂,5% ～10% DMSO等冰冻保护剂;也可以将茎段或茎尖在正常培养基上于 0℃以上低温、暗中或弱光下培养几周,以增强耐冷冻能力。

高渗处理还可以与冷驯化结合使用,其效果更好。将马哈利樱桃的茎尖置于含 0.7 mol/L蔗糖的 MS培养基中预培养 1、2和 3 d,超低温保存后的成活率分别为 84.6%、75%和 83.3%,而对照仅为 9.0% (赵艳华等,1999)。Schabel-Preikstas等 (1992)研究指出,菊花茎尖不经 MS培养基预培养,冻存后成活率只有 33%,经过 1～2 h预培养的冻存率可提高到 87.1%。

Vandenbussche等 (1998)用包埋脱水法保存甜菜离体培养的茎尖,低温锻炼明显地将茎尖的成活率从 37%增加到 70%,冻存后有 50%的植株再生。

低温锻炼可以激活植物体的抗寒机制。Langis等 (1990)报道,麝香石竹茎尖经 5℃低温预处理 16 h,不仅提高了存活率,且茎尖冻存后恢复较快。因此,在超低温保存前,应充分注意材料的选择、预培养和低温锻炼。

三、冰冻保护剂的应用

一般的生物体在没有添加冰冻保护剂的情况下经历低温后是很难存活下来的。所以,生物体的低温保存离不开冰冻保护剂(cryoprotective agent, CPA)。冰冻保护剂也称作抗冻剂,合理地选择冰冻保护剂,对低温保存至关重要。

冰冻保护剂应具有以下特点:易溶于水,对细胞无毒,容易从组织细胞中清除。冰冻保护剂

的作用主要表现在 增加膜透性，加速细胞内的水流到细胞外结冰，稳定细胞膜结构，阻止低温伤害，降低冰点，提高溶液的黏滞性，阻止冰晶生长。

渗透型冰冻保护剂多属低分子中性物质，在溶液中易结合水分子，发生水合作用，使溶液的黏性增加，从而弱化了水的结晶过程，达到保护的目的。常用的渗透型冰冻保护剂有甘油、二甲亚砜（DMSO）、乙二醇（EG）、乙酰胺和丙二醇（PG）等。但渗透型冰冻保护剂的使用浓度，渗入细胞的能力和对水分子活性的影响等各不相同，如甘油适宜于慢速冷却，而 DMSO却易于渗入细胞，并在常温下稍有毒性。

非渗透型冰冻保护剂能溶于水，但不能进入细胞，它使溶液呈过冷状态，可在特定温度下降低溶质（电解质）浓度，从而起到保护作用。非渗透型冰冻保护剂主要有聚乙烯吡咯烷酮（polyvingyl pyrollidone, PVP）、蔗糖（sucrose）、葡聚糖（右旋糖酐，dextrane）、聚乙二醇（polyethylene glycol, PEG）、白蛋白（albumin）和羟乙基淀粉（hydroxyethyl starch, HES）等。此类冰冻保护剂对快速、慢速冷却均有保护效果。

DMSO是迄今广泛采用的一种冰冻保护剂，在单独使用时，表现出较好的效果。但它有一定的毒性，也可能引起基因的遗传变异。DMSO的实际使用浓度通常为 5%～10%。近些年来，许多研究都采用复合冰冻保护剂，即将 10%或 5% DMSO与一定浓度的甘油、糖或糖醇相结合，能显著地提高超低温保存后的存活率。

日本北海道国家农业实验站育种部的 Sakai等在 1990年最先试验获得了植物茎尖玻璃化溶液 PVS2。PVS2的组成是 在 MS培养液中添加 0.4 mol/L蔗糖、30%甘油、15% DMSO和 15% EG。PVS2已在多种植物茎尖的玻璃化冻存中取得较好的保存效果，如山嵛菜（Matsumoto等，1993）、苹果、梨（Niino等，1992）、柑橘（Sakai等，1990）和芋（Takagi等，1997）等。DMSO也是植物体细胞胚、合子胚（Ishikawa等，1997）和悬浮细胞（Yamada等，1993）等多种植物材料的有效玻璃化溶液。但 PVS2并不是对所有植物材料都适合，对某些植物还具有毒害作用，如芒果的茎尖在 PVS2中处理后，冻存的茎尖完全不能成活。

玻璃化液的毒性与其渗透势有关。植物组织受到高浓度的冰冻保护剂的脱水胁迫，影响了植物的成活率，是超低温保存的限制因子。因此，不同的植物材料应选择不同的冰冻保护剂组合。

山嵛菜的茎尖分生组织用含 0.3 mol/L蔗糖的培养基 20 ℃预培养 1 d，用 2 mol/L甘油和 0.4 mol/L蔗糖在 25 ℃处理 20 min，然后加入 PVS2，在 25 ℃处理 20 min，投入液氮保存，获得很高的成苗率（Matsumoto等，1994）。在薄荷的茎尖保存中，用 35%的乙二醇 1.0 mol/L DMSO和 PEG－8000作玻璃化液（Hirai等，1999），在麝香石竹茎尖保存中用 50%乙二醇，15%山梨醇和 6%的 BSA作玻璃化液，获得了 100%的存活率。试验表明，红豆杉细胞愈伤组织超低温保存最有效的冰冻保护剂是 10%山梨醇 ＋10% DMSO的混合物（叶芳等，2001）。Joshi等（2000）的试验表明，10%的甘油 ＋4%的蔗糖是人参细胞的最适宜的冷冻保护剂，其毒性最小，细胞成活率最高达 86.5%。

由此可见，使用复合冰冻保护剂比单独使用更为有效。复合冰冻保护剂使各种成分的保护作用得到综合协调，或产生累加效应，并且能减少甚至消除单一成分的毒害作用。为了降低冰冻保护剂中某些有毒成分（如 DMSO）的毒害作用，冰冻保护剂的预处理应该在低温（0 ℃）下进行，处理时间也不能过长，一般为 30～45 min。

四、化冻方法

超低温保存的效果与化冻速度有密切关系,不同的材料采用的化冻方式也存在着差异。液泡小、含水量少的细胞(如茎尖分生组织),可采用快速化冻的方法。液泡大、含水量高的细胞则一般需要采用慢速化冻法。生长季节中的材料,一般在 37～40℃温水浴中快速化冻比在室温下慢速化冻要好。而木本植物的冬芽在超低温保存后,必须在 0℃低温下进行慢速化冻才能达到良好的效果。

玻璃化冻存的材料在保存终止后,要求快速化冻,以防止由于次生结冰对组织细胞造成的伤害。大量的试验表明,快速化冻法对大多数植物材料都适合,一般是将装有材料的冻存管从液氮中取出,迅速插入 25～40℃ 的水浴中化冻(Towill等,1990;Yamad等,1993)。甘蔗的茎尖采用室温空气流动化冻 10～15min,待材料和玻璃化溶液化解后,立即提出冻存管,可以避免高温引起的伤害。

化冻后的材料要尽快除去保存中的冰冻保护剂,以减少其毒性作用。最常用的方法是在含 1.2mol/L蔗糖的 MS培养液中浸泡 10～20min,也可用 1.5～2.0mol/L山梨醇的培养液洗涤。如兰花胚状体玻璃化保存,其胚状体迅速解冻后,用 1.2mol/L蔗糖溶液洗涤 20min,这样玻璃化保存的胚状体转入 ND培养基上进一步培养,有 60%胚状体能再生植株(Ishikawa等,1997)。

五、再培养

经冻存的材料会不可避免地受到不同程度的伤害。为了减少再培养中的光抑制,利于离体材料恢复生长,冻存的材料一般在黑暗或弱光下培养 1～2周,再转入正常光下培养。再培养所用的培养基一般是与保存前的相同,但有时需将大量元素或琼脂含量减半,有时则在培养基中附加一定量的 PVP、水解酪蛋白等成分以利于生长的恢复。

第五节 超低温保存过程中的遗传变异及其检测技术

无论哪种种质资源的保存方法都是以保持物种原有的遗传特性为出发点。在超低温保存过程中,植物材料是否发生变异是育种工作者十分关心的问题。在超低温保存之前,外植体材料、培养继代时间、培养基成分以及自然突变等因素都可能影响到保存材料的遗传稳定性。

由于植物组织培养中会发生体细胞无性系变异,有的外植体可能具有多倍性或嵌合现象,这种遗传差异往往在表型上难以辨别。当用这种外植体诱导愈伤组织进一步再生植株时,就会发生性状的分离。这种变异是由嵌合体本身所携带的遗传差异造成的。同样,超低温保存后再生过程中的选择作用,也可能使超低温保存的变异得以表现。通过选择适宜的保存方法,对已分化的遗传稳定性好的植物材料进行保存,可以使变异限制在最低程度。

超低温保存涉及到一系列条件的胁迫,如低温胁迫和高渗透压胁迫。这种胁迫可能作为一种选择压,对不同基因型的材料产生选择效应。有研究表明,超低温保存影响细胞系的次生代谢物质的合成能力和恢复生长能力(Hitmi等,1997)。更多研究表明,与低温条件下的离体保存相

比,超低温保存更适合于未分化组织的保存,保存后的愈伤组织也保持了原有的生物合成和分化能力,保存材料的均一程度直接影响到这种选择作用。超低温保存过程中一般不会发生遗传变异。试验表明,草莓 (Kartha等,1980)、木薯 (Bajaj,1983)的茎尖分生组织,经超低温保存后所再生的植株均表现正常。

为了掌握超低温保存材料的遗传变异情况,有必要在保存材料的恢复和再生阶段建立有效的检测体系。目前,形态学观察、细胞学方法、同功酶和分子标记如 RFLP和 RAPD等检测方法常常单独或结合起来用于遗传变异分析。

形态学观察是最简便、直观的检测方法。质量性状发生变化时,很容易通过形态特征判断出来。染色体数目 (包括整倍体和非整倍体的变异)和结构变异 (包括易位、倒位、重复和缺失)可通过细胞学方法检测,在再生植株的细胞分裂过程中通常能检查到上述异常现象。RFLP和 RAPD等分子标记检测方法可用于检测保存材料的 DNA甲基化、染色体重排和碱基变异等。RFLP可以检测 50~100 bp的插入和缺失,并能检测易位、倒位和基因拷贝数的变化。随着生物技术的发展,基于 PCR扩增的分子标记技术将会越来越多地应用于体细胞无性系变异的检测。

思考题

1. 植物离体超低温保存的概念及常用的超低温方法。
2. 植物材料超低温保存的细胞学基础。
3. 超低温保存的方法及其技术要点。
4. 影响超低温保存效果的主要因素及调控措施。

第十章

植物基因转化受体系统

概括地讲,植物基因工程 (plant gene engineering) 包括两大部分,即目的基因的克隆和目的基因的表达。其中目的基因的表达除了一些特殊研究目的外,均需要在植物细胞内完成,也就是说只有将目的基因导入植物细胞中,才能使其实现表达并最终行使相应功能。因此,目的基因如何进入植物细胞是实现基因表达关键之一。在这一过程中,适当的植物细胞类型选择及相应的培养再生系统则成为基因导入的基本前提。因此,植物受体系统的建立是基因工程的重要环节之一。但从技术角度讲,它属于细胞工程的范畴。到目前为止,尽管所有的细胞工程技术体系几乎均可以用于基因转化,但由于植物基因转化对再生体系具有一定的特殊要求,因此,本章针对这些特殊问题就植物基因转化受体系统的建立进行简要的介绍。

第一节　植物基因转化受体系统的条件

植物基因转化 (gene transformation) 受体 (receptor) 系统一般是指用于转化的外植体通过组织培养途径或其它非组织培养途径,能高效、稳定地再生无性系,并能接受外源基因 (foreign gene) 的整合 (recombination),对用于转化选择的抗生素敏感的再生系统 (汪关林,方宏筠,1998)。一个成功的受体系统必须具有较强地接受外源基因的能力,能够高效再生植株,并能将外源基因稳定地遗传给后代。

一、高效稳定的再生能力

用于植物基因转化的外植体必须易于再生，有很高的再生频率，并且具有良好的实验稳定性和重复性。从理论上讲，植物的任何细胞都具有再生完整植株的潜能，但培养的实践证明，并不是所有的体细胞都能再生出完整植株。不同分化程度的细胞，其脱分化和再分化的能力具有很大差异，这在以前的章节已有详细阐述。除了细胞状态本身影响再生能力外，特定植物培养技术的成熟程度亦是重要的影响因素。尽管目前从组织到原生质体的培养技术均已趋于成熟，但不同的植物种类和细胞类型间还有很大差异，在建立受体系统时均需酌情考虑。

此外,现有资料显示,植物基因的转化频率一般只有 0.1%,而且转化操作中的一些特殊处理,如农杆菌 (Agrobacterium) 浸染、基因枪 (gene gun) 轰击等均对细胞均有一定伤害,常使转化后的系统再生能力下降。如果受体系统本身再生频率较低,则获得转化子的几率会更低。贾士荣等 (1992) 认为,基因转化受体系统的再生频率应不低于 80%,且以丛生芽再生植株形式为宜。同时,受体系统应具有较好的实验重复性,使转化实验能在不同实验室和不同时间中重复进行,

使同一体系获得更高效率的应用,也便于实验比较分析。

二、较高的遗传稳定性

植物基因转化是有目的地将外源基因导入植物并使其整合、表达（expression）和遗传,从而达到修饰植物原有的遗传物质、改造不良的农艺性状的目的。这就要求植物受体系统接受外源DNA后不影响其自身的遗传体系,同时又能稳定地将外源基因遗传给后代,保持遗传的稳定性。组织和细胞培养技术的研究显示,离体培养对于生物遗传的影响具有双面性,尽管体细胞无性系变异是普遍的,但在选择适宜培养体系的前提下,又可以较好地保持遗传稳定性或减少遗传变异。如外植体经过愈伤组织再生植株的体系,一般不可避免地要发生体细胞变异,而通过外植体直接再生植株的体系,则体细胞的变异率较小。因此,转基因受体系统的建立,首先要选择适当的培养技术体系,以使转基因植物具有较高的遗传稳定性。

三、具有稳定的外植体来源

要建立一个高效的组织培养再生系统并能应用于基因转化,还需要有稳定的外植体来源。因为基因转化的频率较低,实验重复较多,能比较容易地获得大量外植体的转化体系对于建立适宜的受体系统相当重要。

转化的外植体一般采用种子,无菌实生苗的胚轴、子叶或幼叶,可进行离体快速繁殖的材料如一些植物的试管苗,以及可较高频率诱导的营养变态器官等。无菌材料作为外植体来源,可以避免消毒处理对材料的造成的伤害,从而提高培养效率。同时,离体培养的无菌材料一般是在控制条件下培养的,可以保持较好的一致性,因而有利于提高转化实验的重复性。目前,已有一些植物建立了可以稳定提供外植体来源的培养体系。马铃薯的试管块茎已在国内外许多实验室被用作转基因外植体（Snyder等,1993;司怀军,2003）。唐东芹等（2003）也成功建立了东方百合鳞片叶的再生体系,将起始培养分化的植株鳞片叶作为外植体,继续培养可直接高频率的分化芽,这一体系使得无菌百合鳞叶可作为转基因外植体的稳定来源。

四、抗生素敏感性

植物基因转化中,通常使用两类抗生素（antibiotic）:一类是抑菌抗生素,另一类是选择性抗生素。抑菌抗生素一般是在农杆菌介导的转化体系中用来抑制农杆菌生长的抗生素,以终止农杆菌的侵染反应。选择性抗生素是用来对转化子进行早期筛选的抗生素。植物目的基因（target gene）构建时,通常在转化载体（vector）上装有一个抗生素抗性基因作为选择标记基因,通过在培养基中加入相应的抗生素,即可达到抑制非转化细胞的生长分裂,从而淘汰非转化细胞或植株的目的。对选择性抗生素的选择至少应满足以下两个条件:一是植物受体材料对所选用的抗生素有一定的敏感性,即当培养基中的抗生素达到一定浓度时,能够抑制非转化植物细胞的生长、发育和分化,而转化的植物细胞由于携带该抗生素的抗性基因,因此能正常地生长、分裂和分化;二是抗生素对受体植物没有剧烈的毒性,不会很快杀死植物细胞。实验证明,由于植物种类或同类植物遗传背景的差异,外植体对抗生素的敏感性也有较大差异,过度敏感和过度钝化的植物材料均不适于构建植物转基因的受体系统。

五、农杆菌敏感性

对于利用农杆菌 Ti或 Ri质粒 (plasmid)为载体所介导的植物基因转化来说,需要植物受体材料对农杆菌敏感。不同的植物,甚至是同一植物不同组织的细胞对农杆菌侵染的敏感性都存在很大的差异。因此,在选择农杆菌转化系统前,必须测试受体系统对农杆菌侵染的敏感性,只有对农杆菌侵染敏感的植物材料才能作为受体系统。

总之,对于植物受体系统的要求一般是以能够高效率接受外源基因为条件的。然而,作为以定向改良为目的的基因工程,通常希望转基因后代具有理想的实用价值。所以,在满足转基因要求的技术前提下,受体系统的基础材料还应同时考虑其经济价值潜力。

第二节 植物基因转化受体系统的类型及其特性

植物受体系统的建立是基因转移的基础。已建立的各种基因转化方法均是以受体材料的离体培养技术为基础的,如农杆菌与原生质体共培养转化方法,其技术基础是必须具有成熟的原生质体培养技术。目前,由于众多类型的植物离体培养技术的完善,也使转基因受体系统具有了很大的选择范围,从而建立了适合不同植物和不同培养技术的转基因方法。然而,由于培养类型的不同,作为转基因受体系统的特性和实用范围也具有一定差异。因此,了解不同培养技术体系作为转化受体的特性,有利于帮助研究者选择适宜的受体系统,获得较高的转化效率。

一、经过愈伤组织的受体系统

经过愈伤组织的受体系统是指外植体经脱分化培养诱导愈伤组织,并通过分化培养获得再生植株的受体系统。尽管原生质体作为受体系统也经过愈伤组织,但用于其具有一些特殊性,后面将专门作为一个类型单独介绍。因此,这里所讲的经过愈伤组织的受体系统,均为以植物组织为外植体的类型。

经过愈伤组织的再生系统包括利用农杆菌直接侵染外植体,然后经过培养形成愈伤组织,再分化成植株;也包括将植物外植体先诱导形成愈伤组织,再利用愈伤组织转化外源基因,进而再生植株。其共同特点是:a 外植体来源广泛,多种组织、器官均可诱导愈伤组织,甚至分化程度较深的组织、器官也能诱导出愈伤组织;b 扩繁量大,可获得较多的转化植株;c 适用的植物范围广,几乎适用于每一种通过离体培养途径能再生植株的植物;d 由于从愈伤组织分化的不定芽常是多细胞起源,因而嵌合体多;e 获得的再生植株无性系变异较大,转化的外源基因遗传稳定性较差。

建立经过愈伤组织的受体系统,其植物外植体通常采用叶片、茎段、子叶和上胚轴等。在以农杆菌介导的转化体系中,受体细胞对农杆菌的感受状态往往直接影响转化效率。因此,如果直接使用外植体组织进行农杆菌侵染,应注意从活跃生长的植物部位选取外植体。如果采用将外植体先诱导成愈伤组织再进行转化的方式,从理论上讲,大多数愈伤组织细胞处于分生细胞状态,易于接受外源基因,因此转化率较高。但需要注意的是,愈伤组织必须保持良好的生

长状态，继代培养的愈伤组织，其继代周期不能过长，以免细胞老化而不利于转化和转化后的植株再生。

二、不经过愈伤组织的受体系统

不经过愈伤组织的受体系统也称为直接分化再生系统，是指外植体细胞越过脱分化阶段，直接分化出不定芽，从而获得再生植株的受体系统。现有研究显示，采用叶片、幼茎、子叶、胚轴以及一些营养变态器官等为外植体时，在适宜的培养技术控制下，均可直接分化出芽。这一受体系统的主要特点是：a 获得再生植株的周期短，操作简单；b 体细胞无性系变异相对较小，可较好地维持受体植物的遗传特征；c 转化的外源基因能稳定遗传，特别是由茎尖分生细胞建立的直接再生系统的遗传稳定性更佳；d 由于不定芽的再生可能起源于多细胞，因此，直接再生系统同样可能出现较多的嵌合体；e 由外植体细胞直接分化芽比诱导愈伤组织要困难得多，要使转化细胞直接分化成植株则难度更大，因此，其转化频率可能比愈伤组织要低。现有研究显示，这种直接分化受体系统比较适于无性繁殖植物，而有性繁殖植物则相对要困难一些。

植物外植体对直接分化受体系统的影响较大。从组织类型上讲，子叶、叶片、胚轴和某些营养变态器官通常比较容易诱导直接分化。从细胞状态讲，一些处于薄壁细胞状态的外植体，由于大多数细胞的分裂周期处于 G_0 期状态，其调节的可塑性较大，因而比较容易诱导直接分化。有关这一内容，第一章中已有较好的范例。

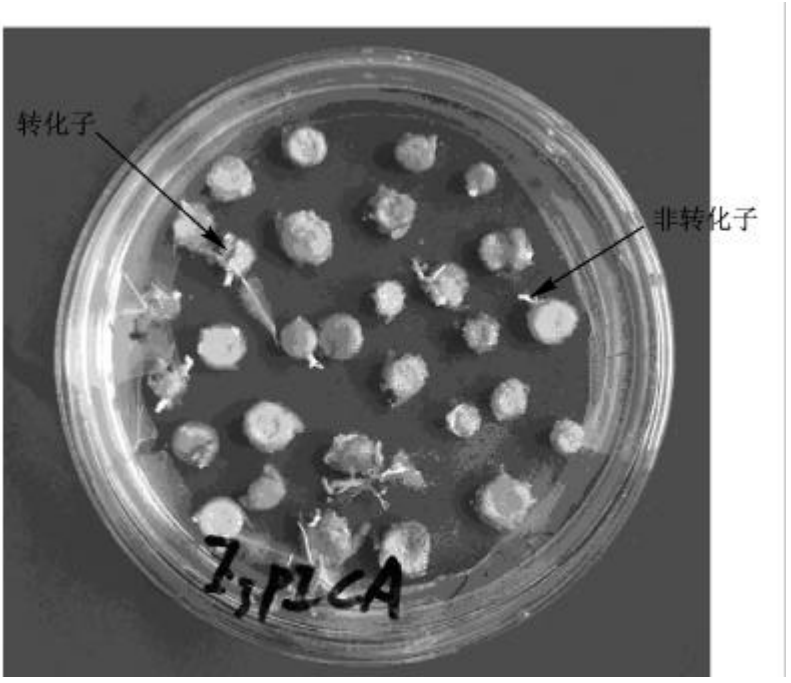


图 10.1　马铃薯试管块茎切片作为转化受体的植株直接再生

近年来，由于细胞工程技术体系的不断完善，一些营养变态器官的离体诱导技术相继建立起来，为相应的植物受体系统的建立提供了较为有利的外植体材料。华中农业大学马铃薯实验室利用马铃薯试管块茎建立的直接再生系统（图 10.1），其再生率在有些基因型中可达到 100%，转化率可达到 40% 以上，比采用叶片、茎段的相应效率提高了 20% 以上。这一途径也为其它可产生营养变态器官的植物转基因受体系统的建立提供了借鉴。

三、原生质体再生系统

原生质体是“裸露”的植物细胞，由于除去了细胞壁的屏障，能够直接高效地摄取外源 DNA 或遗传物质，甚至细胞核，因此转化效率高且适合于现在建立的所有转化方法。同时，原生质体受体系统通常处于相对均匀和稳定的控制环境中，从理论上说，有利于准确的转化和鉴定。通过原生质体培养，细胞分裂可形成基因型一致的细胞克隆，因此从转化原生质体获得的转基因植株

的嵌合体少。

早在20世纪70年代初就有研究者用裸露的DNA处理烟草原生质体,观察到所标记的DNA分子靠近细胞核的情况。随着Ti质粒作为植物基因载体的使用,农杆菌与原生质体"共培养转化"是最早建立的一种转化方法。然而,由于目前许多植物的原生质体培养体系还不成熟,受原生质体培养技术的限制,转化试验的重复性较差,使这一体系在很多植物中还处于完善阶段。同时,原生质体的培养周期长,受体细胞本身的体细胞变异频率高,遗传稳定性差,给转基因后代的鉴定和利用带来许多困难,从而也限制了该系统的应用。

四、细胞系及其体细胞胚受体系统

经过筛选和优化的植物细胞悬浮培养的细胞系,通常具有较好的遗传和生理状态的一致性,通过一定的培养基调节,可使细胞进入胚性状态进而形成体细胞胚。这种培养系统在培养技术上相对于原生质体来说要容易得多,从转化效率的角度讲,又优于其它组织培养系统,因此被认为是最为理想的基因转化受体系统。概括起来,这一系统的主要特点有:a 胚性细胞繁殖量大,同步性好,是理想的基因转化感受态细胞,因而具有很强的接受外源DNA的能力,转化率高。b 转化后的胚性细胞即可通过体细胞胚途径发育成完整植株,由于体细胞胚的发生多数为单细胞起源,因此转化获得的转基因植株嵌合体少。c 体细胞胚具有两极性,从而减少了不定芽发育途径中的生根培养过程,特别对那些生根困难的植物来讲,通过这一途径获得转基因植株更为有利。d 对于转基因系来讲,来自于同一体细胞胚的后代个体间遗传背景一致,无性系变异小,有利于转基因植株的生产和推广。

五、生殖细胞受体系统

以生殖细胞如花粉粒和卵细胞为受体细胞进行基因转化的系统称之为生殖细胞受体系统,也叫种质系统。目前,主要从两个途径利用生殖细胞进行基因转化:一是利用小孢子和卵细胞的单倍体培养,诱导出胚性细胞或愈伤组织细胞,从而建立单倍体的基因转化受体系统;二是直接利用花粉和卵细胞受精过程进行基因转化,如花粉管导入法、花粉粒浸泡法和子房微注射法等。由于以具有全能性的生殖细胞直接为受体细胞,因此具有更强的接受外源DNA的潜能,一旦将外源基因导入这些细胞,犹如正常的受精过程一样,会收到"一劳永逸"的效果。同时,由于受体细胞是单倍体细胞,转化的基因无显隐性的影响,能使基因充分表达,有利于性状的选育,而且通过加倍后即可成为纯合的二倍体新品种,大大缩短了复杂的选育纯化过程。

花粉管通道法和子房注射法由于操作简单,受实验室条件限制较小,因而是目前利用性细胞受体中研究较多的方法。同时,花粉管通道法可利用植物自身的授粉过程,将现代的分子育种与常规育种紧密结合,被认为是十分有潜力的受体系统。然而,由于这些方法受到季节的影响,只能在短暂的开花期内进行,也使其应用受到限制。

利用花粉或小孢子培养系统作为受体系统,可以建立单倍体水平上的细胞系,从而在单倍体水平上实现基因转化。在花粉及小孢子培养技术成熟的植物种类中,这是更为理想的受体系统。特别对一些多倍体植物,利用这一系统将可大大提高转化率。所以,该系统是十分有潜力和可能大力发展的植物受体系统之一。

第三节　植物基因转化受体系统的建立

建立一个好的受体系统是实现基因转化的先决条件，关系到基因转化的成败。受体系统的建立主要依赖于植物组织培养技术，它与一般植物的组织培养相比要求更高。从受体系统建立的内容来看，包括外植体的选择制备，高频再生系统的建立，抗生素的敏感性试验及农杆菌的敏感性试验（农杆菌介导的基因转化系统）等。

一、高频再生系统的建立

所谓高频再生系统必须具有4个条件：a. 外植体的组织细胞具有诱导愈伤组织和再生完整植株的能力，并且最好是外植体能直接分化出芽；b. 芽的分化率高；c. 易于离体培养，具有高度可重复性；d. 体细胞无性系变异小。为了建立这样一个高频再生系统应进行以下研究工作。

1. 外植体的选择

尽管目前认为植物体的任何组织和器官都可以作为建立再生系统的外植体，甚至作为植物基因转化的外植体，但是不同外植体的脱分化和再分化能力、细胞全能性潜在趋势及接受外源基因的感受态程度等都有很大差别，即使是同一组织器官的不同部位也有明显差异。所以，要建立高效的基因转化体系，首先要选择具有潜在地能较大接受外源基因能力的植物细胞类型。现有研究表明，外植体的选择应重点考虑以下4个方面的问题。

⑴ 外植体生理年龄

任何植物的发育过程都要经过幼年型及成年型两个阶段。由于植物发育是处于一个连续的统一系统中，因此，同一个植株个体有些组织器官是幼年型，有些是成年型，同一组织器官的不同部位也存在相应的差异。幼年型和成年型的外植体在形态解剖结构及细胞生物学等方面均存在着很大差别，特别是对诱导条件的反应能力、接受外来物质的状态差异十分显著。成年型的细胞在自然条件下不会返回到幼年型，在离体人工培养下忍受或接受调节的能力相应也较低，因此，不仅培养起来较困难，有的甚至完全失去分生能力。同时，成年型的外植体即使可培养成功，其接受外源基因的频率也较低。因此，选择生理上相对年轻的外植体类型建立受体系统，不仅可提高培养效率，同时也可保证较高的转化率。此外，生理年龄小的外植体本身，其细胞群体常常具有较好的遗传一致性和稳定性。因而，选择这类外植体建立的受体系统，也可相对降低体细胞变异频率，保证体系的遗传稳定性。

⑵ 外植体细胞的生理状态

外植体的生理状态与其分生能力有着直接的关系。代谢活跃、休眠萌动的细胞具有更强的生长潜能，有利于培养成功。有研究发现，在离体培养条件下芽休眠期长短和萌动的时间与田间自然条件下十分相似（Altman和Goren, 1974），即离体培养下，如果取处于休眠中的外植体培养，同样也要经过休眠期。因此，取将要萌动的材料作为外植体可缩短培养周期。

作为转基因的外植体必须具有良好的增殖能力，并且应在继代培养中保持胚性和旺盛生长。如减数分裂前的幼嫩花序和减数分裂后的珠心组织作为外植体，常常表现出增殖快，再生能力强的特点。

外植体细胞的生理状态还与母体植株本身的生理状态有关,特别是一些多年生植物个体差异更为明显。取自母体植物生长旺盛但不徒长的相应外植体,通常细胞充实,对离体操作的忍耐性强,细胞全能性表达能力强,因而更容易建立高效再生的受体系统。

⑶ 外植体的遗传背景

人类从事植物基因工程,其中一个重要目的就是为了实现植物遗传性状的定向改良。因此,受体的选择通常首先考虑的是需要改良的目标。然而,大量的试验显示,许多欲改良的植物品种或类型,其高频再生系统的建立十分困难,这一现象在植物组织培养实验中早已证明,其根本原因是外植体的再生能力与其基因型有着直接的关系。现已明确,植物对离体培养的反应受其自身的遗传背景影响,培养中外植体形成愈伤组织的能力及其再生能力受基因控制。有资料显示,外植体形成愈伤组织和再生植株受不同基因的调控,在烟草等茄科植物中,至少有两对基因与愈伤组织形成有关。而离体条件下的形态发生研究表明,再生植株涉及到一系列与形态发生有关的基因调控 (见第一章)。由于遗传背景的差异,使同种植物不同品种和类型间的基因型不同,从而表现出再生能力的差异。因此,在选择外植体时应对同一种植物的不同基因型的外植体进行再生能力筛选,选择再生能力强的基因型作为外植体其转化较易成功。

⑷ 外植体的选择与受体系统类型的匹配

外植体的选择除了考虑以上问题外,还应注意与相应的受体系统匹配。由于不同的再生系统通常对外植体具有一定的特殊要求,因而,外植体选择时考虑的侧重点是不同的。例如,以组织培养体系为主的受体系统,其外植体的选择通常遵守上述基本原则。如果受体系统是以花粉单倍体细胞为基础建立,则首先要考虑实验植物的最佳培养反应的花粉发育时期。因为,对于花粉和小孢子培养来讲,植物之间的最佳取材时期差异非常大。同是茄科植物,烟草、马铃薯的花粉细胞培养以花粉发育处于单核细胞期为宜,而番茄则以四分体晚期的小孢子培养效果最好。此外,有些受体系统通常采用二次培养的产物为外植体,其初期培养的外植体对以后的体系影响也较大。如原生质体系统,其原生质体来源可以是无菌叶片,也可以是悬浮培养细胞,还可以是性细胞原生质体,三者分离的原生质体在生理状态上有很大差异,这些差异除了后期培养条件的影响外,还与初期培养时的外植体有关。特别是悬浮培养细胞,选择胚为外植体建立的悬浮系和选择营养组织细胞建立的悬浮系,其细胞状态和分化能力通常有较大差异,前者表现出在增殖和分化两个方面均具优势,而后者在分化上的调控往往比较困难。外植体选择时,必须充分考虑这一点。

2. 培养基选择

培养基是离体培养中外植体生长发育的营养环境。目前,已有许多植物培养基可供选择 (见第三章)。植物种类不同,需要的营养条件通常有一定差异。在建立某一植物受体系统之前,需根据该植物对营养条件的需求选择相应的培养基。

⑴ 植物的营养特性

供试植物的种属类型、繁殖特性、栽培条件及品种等不同,对营养条件的需求则不同,实验前充分了解这些背景,有助于选择适宜的培养基。例如,有的植物易吸收硝态氮,而氨态氮对其细胞生长有抑制作用,则培养基应选择高硝态氮的类型。如大多数禾本科作物通常需要较高浓度的硝态氮,可选用 N6培养基。有时,外植体类型不同,对培养基成分要求也有一定差异。如以活跃生长部位的组织细胞为外植体培养,对培养基的适应范围通常较宽,而处于分化状态的组织细胞,则对培养基的要求较严格。选择培养基还应考虑受体系统类型,如原生质体受体系统其培

养基通常较复杂,而组织培养受体系统则可相对简单。

⑵ 选择原则

关于植物受体系统建立中培养基选择具体应考虑的问题,那杰在《植物基因工程原理与技术》一书中曾有详细总结,主要包括:a. 同一物种的培养基有类同性,即同一物种的不同亚种、品种间的基本培养基类型基本相同;b. 同一植物的不同组织器官的基本培养基类型基本相同;c. 植物组织培养时所需营养成分与田间栽培条件有相似性;d. MS培养基是大多数植物的通用培养基;e. 无机盐的浓度是基本培养基类型的重要因素,应该作为培养基选择的重要参数;f. 有机成分主要是种类的变化,每种成分含量的变化不大;g. 不可忽视培养基中碳源的种类和浓度,应该在确定基本培养基类型后研究最适的碳源种类和浓度;h. 提高磷酸根的水平可以抵消 IAA 对芽的抑制作用,促进芽的分化;i. 水解酪蛋白能加强细胞分裂素对芽的诱导分化作用,特别是当有高水平的 IAA 时更为显著。在一定的范围内,酪氨酸可以有效地替代水解酪蛋白的作用。

⑶ 激素的选择

在组织培养中,生长素和细胞分裂素是目前使用最为广泛的两类激素。生长素的主要功能是诱导启动细胞分裂、促进愈伤组织形成和生根等。目前常用的生长素主要有 2,4-D、NAA、IBA 和 IAA。此外,2,4,5-T、NAA 在有些实验中也有使用。其中 IAA 和 IBA 主要用于生根,IAA 还能与细胞分裂素互作促进芽的增殖。2,4-D、2,4,5-T、NAA 则多用于愈伤组织的诱导和生长。细胞分裂素的主要功能是促进细胞分裂,改变顶端优势,促进芽的分化等。常用的几种细胞分裂素的强度由强到弱的顺序是:ZT、BAP、6-BA、2iP 和 KT。近年来的研究表明,细胞分裂素有促进生长素效应的作用,因此,在一个培养体系中,生长素和细胞分裂素必须协调使用,才能建立良好的再生体系。关于生长素和细胞分裂素在离体培养中对形态建立的调节,请参考1~3章的相关内容。

不同植物对细胞分裂素与生长素种类的敏感性不同,因此激素种类的选择应以植物种类而定。如单子叶植物生长素通常使用 2,4-D 较多,而双子叶植物则多使用 NAA。同一植物的不同组织在愈伤组织诱导和芽分化过程中对激素浓度的要求也不相同,所要求的水平取决于细胞内源激素的水平,即使是同一植物也很难有完全相同的激素配比。所以,离体培养体系建立的初期,必须根据外植体情况对激素配比浓度进行实验筛选。实验中常发现,有些植物不能或难以得到芽的分化,这可能是由于未满足其分化的条件,若破例使用一些不常用的激素或激素抑制物,如脱落酸、2,3,5-三碘苯甲酸(0.02mg/L)和 7-氮-吲哚硝基苯酰溴(0.01~0.1mg/L)等,就有可能启动芽的分化。

二、抗生素敏感性

前面已经讲到,植物转基因中通常有两种目的要使用抗生素:一是抑制农杆菌生长,二是筛选转化细胞。抗生素通常对细胞的生长具有抑制和毒害作用,但对植物细胞而言,这种抑制和毒性的程度在不同抗生素间具有一定差异。因此,在受体系统建立时,需要对相关的抗生素种类及其使用浓度进行实验筛选。由于抗生素的使用浓度通常与一定的植物细胞对抗生素的敏感程度有关,所以,一般将这种针对抗生素筛选的实验称之为抗生素敏感性实验。

对于抑制农杆菌生长的抗生素实验而言,其抗生素种类和浓度的筛选要考虑植物种类和农杆菌株系两个方面的因素。通常要求使用的抗生素是对植物细胞无毒,不显著抑制植物细胞生

长的类型。使用较多的是β-内酰胺类抗生素,如氨苄青霉素(ampicillin)和羧苄青霉素(carbenicillin)。头孢霉素因其对植物细胞毒性小,且具有广谱抗性,因此,近年来被广泛用于转化实验中。关于抗生素的使用浓度,需要根据植物材料和农杆菌株系进行试验确定。总体来讲,以能够有效抑制农杆菌生长而不妨碍植物细胞生长的浓度为宜。由于植物细胞类型不同,对抗生素的忍耐能力常有较大差异,实验中必须充分考虑这一点。

用于转化子筛选的抗生素,是根据转化载体上携带的抗生素标记基因确定的。因此,抗生素试验一般主要是确定适宜的使用浓度。尽管从理论上讲,只有转化获得了抗生素基因的细胞才能在含有相应抗生素的选择培养基上生长,但实验证明,当选择性抗生素浓度过低时,通常会获得许多假阳性植株,而当抗生素浓度过高时,又会抑制一些真正的转化细胞的生长,降低培养效率。所以,确定适当的选择性抗生素浓度是转化系统建立必不可少的实验步骤。

三、农杆菌敏感性试验

农杆菌介导的基因转化是目前植物基因转化中使用较广、技术较成熟的实验体系。然而,实验植物是否为农杆菌的天然宿主,则是首先要考虑的问题。即使是农杆菌的天然宿主,由于植物的种属不同,甚至是同一物种的不同基因型,或同一基因型的不同器官和组织,对不同农杆菌的敏感性都会有差异。因此,选择对农杆菌敏感性较高的受体植物及其适宜的组织细胞类型是成功转化的重要因素。

由于目前使用的农杆菌多为改良的Ti和Ri系统,为便于实验观察,可在进行正式转化实验之前利用野生型农杆菌菌株浸染植物材料,根据结瘤(或发状根)的诱导率、发生时间及生长状态等确定其敏感性,以筛选对农杆菌敏感的材料建立受体系统。

第四节 受体系统常见的问题及其解决途径

一、再生能力及其遗传稳定性

用于植物转基因的组织培养体系,其核心是创造大量的可再生细胞,且这些细胞能在继代繁殖、选择培养等过程中保持其再生能力。用于植物转基因的组织培养体系与一般的植物组织培养体系有一定差异,因为作为转化体系的培养有一个较长的抗性愈伤组织筛选继代过程。而一般情况下,植物材料(如愈伤组织)随着继代次数的增加其再生能力下降,因此,减少筛选继代次数,促进快速分化成苗,选用合适的外植体和采用最适的筛选培养基等,是解决抗性愈伤再生能力下降的主要途径。

体细胞变异是遗传改良可加以利用的资源,利用组织培养创造体细胞变异用以改良作物性状的报道已屡见不鲜。但对植物基因转化系统来说,体细胞变异容易与转基因引起的变异相混淆,从根本上说,体细胞变异也不利于我们定向改良植物的目的。要减少体细胞变异就必须减少组织培养时间,甚至取消组织培养过程。不需要组织培养的作物基因转化已经在大豆、棉花、蚕豆和花生等作物上有了成功的报道,具体做法是用基因枪轰击胚轴或芽的分生组织,收获种子,然后在后代群体中筛选转化植株。这种方法的限制因子是转化受体的制备困难,转化效率低等。

据报道，蚕豆顶芽的转化率为 0.06%，腋芽的转化率为 0.03%（Russel等，1993）。在一些禾谷类植物中，现在也有直接用幼胚作为转化受体，然后通过培养筛选转化体的报道，这样就减少了制备受体细胞过程中的体细胞变异。事实上，体细胞变异的干扰一直是目前基因工程中一个十分棘手的问题。稳定良好的受体系统和准确的检测技术相结合，可能是解决这一问题的途径之一。

二、愈伤组织褐化

愈伤组织的褐化是离体培养中常见的问题。褐化可发生在愈伤组织继代培养阶段，也可发生在分化植株的过程中。褐化是细胞老化、停止生长的结果。褐化愈伤组织的细胞如果没有及时的补救措施，会导致细胞的大量死亡或整个愈伤组织的死亡。转化实验中，由于抗生素的选择压力存在，愈伤组织褐化有时表现得更为突出。愈伤组织褐化除了与品种基因型、外植体来源、愈伤组织继代次数等有关外，培养基及培养条件常常会对褐化的程度具有关键性的影响。也有一些研究报道，培养基中添加较高的选择和抑菌抗生素，容易造成抗性愈伤组织的褐化。

从生化角度讲，愈伤组织褐化通常与细胞分泌的酚类物质和乙烯代谢有关。因此，许多实验显示，添加抗氧化剂、吸附剂等可适当控制愈伤组织褐化。此外，培养基中添加低浓度的 $AgNO_3$，也具有保持愈伤组织分化活力（胚性）的作用，但不同实验的报道结果不同。林拥军等根据多年从事遗传转化实验研究提出，采用合适的筛选培养基是防治抗性愈伤组织褐化的最行之有效的措施。

三、再生植株玻璃化

离体培养再生植株的玻璃化现象在转化体系中也时常发现，有些甚至玻璃化的频率很高。然而，目前还缺乏对玻璃化现象发生机制的深入研究。

当前，玻璃苗和正常试管苗在形态和生理生化上的差异是研究的重点。大多数研究者希望通过研究两者在形态和生理生化上的差异，来解释玻璃化现象发生的机理和控制方法。在形态解剖特征上，玻璃苗表现为半透明状，茎尖顶端分生细胞较小、结构简单、缺少维管束原组织，茎叶细胞体积膨大、液泡化程度高、胞质稀薄、细胞核变小和细胞无明显长轴等现象。在生理生化特征上，玻璃苗的细胞过度含水，还原糖、蔗糖、K^{2+}、Ca^{2+}和 Cl^-离子含量明显增高，而木质素、叶绿素、蛋白质、Fe^{3+}和 Cu^{2+}的含量则明显降低。研究显示，影响玻璃苗发生的因素有许多，例如，材料差异、培养基水势、环境温度、碳源种类及浓度、无机盐和离子浓度等。目前，各研究者在控制试管苗玻璃化方面提出了一些具体的措施，这些措施包括：增加光照强度，提高琼脂浓度，降低培养温度，使用透气性的封口膜以降低培养器皿内的相对湿度，降低培养基中 NH_4^+ 浓度而增加 NO_3^- 浓度，增加培养瓶中 CO_2 浓度，修正培养基中激素比例等，在一定程度上能降低甚至消除玻璃苗的问题。

四、影响受体系统转化效率的因素

1. 农杆菌菌株

(1) 农杆菌菌株类型

由于农杆菌染色体基因的作用直接影响 T－DNA 转移的效率，不同的农杆菌菌株有不同的宿主范围，并有其特异侵染的最适宿主。不同类型的农杆菌菌株的毒力（侵染力）不同。一般而

言,3类农杆菌菌株的侵染力的排列顺序为:农杆碱型(琥珀碱型)菌株(如 A281)>胭脂碱型菌株(C58)>章鱼碱型菌株(Ach5, LBA4404)。选择适宜的转化菌株对于植物转基因工作来说是非常重要的。

(2) 农杆菌菌株的侵染活力

高侵染活力的菌株一般处在对数生长期,即 0.3~1.8 OD范围(1.0 OD≈1×10⁹ cells/ml)。一般用 0.3~1.0 OD的农杆菌菌液接种植物材料。

2. Vir基因活化的诱导物

Vir基因的活化是农杆菌 Ti质粒转移的先决条件。研究显示,酚类化合物、单糖或糖酸、氨基酸、磷酸饥饿和低 pH等因素都影响 Vir区基因的活化。

在操作过程中,最常用的诱导物是乙酰丁香酮(AS)和羟基乙酰丁香酮(HO-AS),但 AS效果更佳。

AS的使用浓度一般为 5~200 μmol/L,培养基的 pH为 5.1~5.7,共培养温度为 15~25℃,D-半乳糖酸为 100 μmol/L,葡萄糖酸为 10 mmol/L,葡萄糖为 10 mmol/L,磷酸根浓度为 0~0.1 mmol/L。

3. 外植体的类型和生理状态

正确选择外植体是植物转基因操作成功的重要条件,明确受体细胞的转化能力是选择外植体的依据。

目前,作为转基因的外植体材料涉及植物的各个组织和器官,但各种外植体材料的转化率有明显差异。对于某个具体的植物种类,其最适的外植体类型需根据前面介绍的相关因素选择。

1997年,Villemont研究指出,转化只发生在细胞分裂的一个较短时期内,只有处于细胞分裂S期(DNA合成期)的细胞才具有被外源基因转化的能力。因此,细胞具有分裂能力是转化的基本条件。发育早期的组织,如分生组织、维管束形成层组织、薄壁组织及胚、雌配子体和雄配子体等,这些组织的细胞具有很强的分裂能力。当这些组织发生创伤或环境诱导时,则加速分裂,即处于转化的敏感期。已经分化的组织细胞的转化能力与其发育程度有重要关系。一般来说,发育早期(幼年期)的组织细胞转化能力较强,这已被大量的实验结果所证实。

4. 外植体的预培养

外植体的预培养与外植体的转化率有明显关系。每种外植体均有其最佳预培养时间,时间太长反而降低外植体的转化率,一般以 2~3 d为宜。

一般认为,外植体的预培养有以下作用:a. 促进细胞分裂,使受体细胞处于更容易整合外源DNA的状态;b. 田间取材的外植体通过预培养起到驯化作用,使外植体适应于试管离体培养的条件;c. 有利于外植体与培养基平整接触。因为外植体在开始培养过程中,由于其迅速生长而出现上翘和卷曲,使农杆菌的接种切面离开培养基,致使农杆菌生长受抑制而实现对受体的转化,预培养则有利于改进这种状况。

5. 外植体的接种及共培养

外植体的接种是指把农杆菌工程菌株接种到外植体的侵染转化部位。常用的方法是将外植体浸泡在预先准备好的工程菌株中,浸泡一定时间后,用无菌吸水纸吸干,然后置于共培养的培养基上进行共培养。共培养即指农杆菌与外植体共同培养的过程。

外植体的接种时间和接种农杆菌菌液的浓度因物种和外植体的类型不同而不同。接种时间

过长或接种菌液浓度过高容易引起后续培养中的污染;接种时间太短或接种菌液浓度过低,易造成转化效率低下。一般的接种时间为 1～30 min,接种菌液浓度为 0.3～1.5 OD,具体数据列于表 10.1。

表 10.1　不同作物适宜的接种时间和接种菌液浓度*

外植体种类	接种时间/min	接种菌液浓度/OD
小麦未成熟胚和胚性愈伤组织	60	0.5～1.0
水稻胚性愈伤组织	15	1.0～1.5
玉米未成熟胚	10	1.0
棉花下胚轴	1～3	0.3～0.6
大豆子叶节	10～30	0.3～0.6

*以上数据由 Mansanto公司程明博士提供。

农杆菌与外植体共培养在整个转化过程中是非常重要的环节。通过农杆菌的附着,T－DNA的转移和整合都在这个时期内完成。因此,掌握共培养技术和条件是转化成功的关键。前面已提到,农杆菌附着外植体表面后并不能立刻转化,只有在创伤部位生存 8～16 h之后的菌株才能诱发肿瘤。因此,共培养时间必须长于 8～16 h,但也不宜太长,否则会由于农杆菌的过度生长而使植物细胞受到毒害而死亡。一般共培养时间为 3 d。大多数研究者使用相同的培养基悬浮菌液和共培养,且多采用低盐培养基。多数共培养基中加入 AS和单糖类化学诱导物,并加入较高含量的生长素类(如 2,4－D)激素,而避免使用细胞分裂素类(如 BA和 TDZ)激素。因为生长素类激素能促进 T－DNA的转移,细胞分裂素类激素则抑制 T－DNA的转移。有关生长素的作用现有报道也不尽一致,例如,Khanna和 Raina(1999)在水稻转化研究中发现,在共培养基中加入 2,4－D的处理,其转化效率反而降低。

6. 转化细胞的选择培养和转化植株再生

(1) 转化细胞的选择

选择转化细胞是基因转化的重要步骤。转化细胞和非转化细胞在非选择培养基上的生长存在着竞争,而且非转化细胞在这种条件下的生长往往更具优势,转化细胞反而生长较弱。

一般在转化载体构建时就应该考虑后期转化细胞的选择问题。通常的做法是在转化载体上加入一个选择标记基因。这样,在选择培养基中加入选择试剂就可以抑制非转化细胞的生长,而对转化细胞的生长无抑制作用,从而起到选择作用。

选择试剂的使用浓度,即选择压应根据植物的特性来定。比较敏感的植物要用较低浓度的选择试剂。另外,一般选择试剂对植物材料有毒害,直接影响植株的再生。倘若选用的某种植物中有很高的背景值,则需改换选择方案,所以在制定选择方案之前要先做抗生素敏感试验。

选择方法归纳起来有两种:一种是先再生后选择,即在植株再生过程不加选择压,待植株再生后再进行选择。这种做法最大的弊端是嵌合体严重,假转化体多,后期选择困难。另一种是先选择后再生,即在转化后愈伤组织诱导或不定芽分化培养时就加入选择压。这种方法所获得的再生植株嵌合体少,假转化体比例低。

(2) 转化植株再生

转化体系的转化频率高低在很大程度取决于转化植株再生系统的优劣,而再生系统的主要

因素是培养基。因此,筛选和优化植株再生培养基是提高转化效率的一个重要因素。

思考题

1. 植物基因转化受体系统的概念。
2. 植物基因转化受体系统的特点。
3. 植物基因转化受体系统的类型及特性。
4. 影响植物基因转化频率的因素及调控措施。

主要参考文献

1. kimoto C, Aoyagi H, Tanaka H. Endogenous elicitor－like effects alginate on physiological activities of plant cells. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52：429～436
2. Aksenova N P, Konstantinova T N, Chailakhyan M K H. Morphogenetic effect of blue and red light in the illumination of underground and above－ground potato organ in vitro cultivation. Dokl Akad Nauk SSSR. 1989, 305：508～512
3. Aleith F, Richter G. Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. Planta, 1990, 183：17～24
4. Altman A, Goren R. Growth and dormancy cycles in Citrus bud cultures and their hormonal control. Physiol Plant; 1974, 30：240～245
5. Altmann T. Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants. Planta, 1999, 208：1～11
6. Apuya N R, Zimmerman J L. Heat shock gene expression is controlled primarily at the translational level in carrot cells and somatic embryos. Plant Cell, 1992, 4：657～665
7. Ashmore S E. Status report on the development and application of In vitro techniques for conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic resources Institute. Rome, 1997
8. Attfiled E M, Evans P K. Stages in the initiation of root and shoot organogenesis cultured leaf explants of nicotiana tabacum cv. Xanthi nc. J Exp Bot; 1991, 42：59～63
9. Austin S, Baer M A, Helgeson J P. Transfer of resistance to potato leaf roll virus from Solanum brevidens into Solanum tuberosum by somatic fusion. Plant Sci, 1985, 39：75～82
10. vivi Y, Lev－Yadun S, Morozova N et al. Clausa, a tomato mutant with a wide range of phenotypic perturbations, displays a cell type－dependent expression of the homeobox gene Let6／TKn2. Plant Physiol. 2000, 124：541～551
11. Ayabe M, Sumi S. A novel and efficient tissue culture method－“stem－disc clone culture”－for producing virus－free garlic (Allium sativum L.). Plant Cell Reports, 2001, 20：503～507
12. Bajaj Y P S. Biotechnology in agriculture. (Natesh et al. eds). Oxfod & IBH Pub Co, 1987, 109
13. Bajaj Y P S. Cassava plants from meristem cultures freeze－preserved for three years. Field Crop Res, 1983, 7：161～167
14. Banno H, Ikeda Y, Niu Q W et al. Overexpression of arabidopsis ESR1 induces initiation of shoot regeneration. Plant Cell, 2001, 13：2609～2618

15. Barsby TL, Shepard JF, Kemble RJ et al. Somatic hybridization in the genus Solanum: Solanum tuberosum and Solanum brevidens. Plant Cell Reports, 1984, 3: 165～167
16. Benson EE, Hamill JD. Cryopreservation and post freeze molecular and biosyntythetic stability in transformed roots of Beta vulgaris and Nicotiana rustica. Plant Cell Reports, 1983, 7: 161～167
17. Berios EF, Gentzbittel L, Kayyal H. AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (Helianthus annuus L.). Theor Appl Genet, 2002, 101: 1299～1306
18. Bhatti MH, Percival T, Davey CDM et al. Cryopreservation of embryogenic tissue of a range of genotypes of sweet potato (Ipomoea batatas [L] Lam.) using an encapsulation protocol. Plant Cell Reports, 1997, 16: 802～806
19. Bhojwani SS, Cocking EC. Isolation of protoplasts from pollen tetrads. Nature New Biol, 1972, 239: 29～30
20. Biedinger U, Schnabl H. Ethane production as an indicator of the regeneration potential of electricity－fused sunflower protoplasts (Halianthus annuus L.). Plant physiol, 1991, 138: 417～420
21. Binding H. Somatic hybridization experiments in Solanaceous species. Mol Gen Genet, 1976, 144: 171～176
22. Binsfeld PC, Wingender R, Schnabl H. Cytogenetic analysis of interspecific sunflower hybrids and molecular evaluation of their progeny. Theor Appl Genet, 2000, 102: 1280～1285
23. Biotechnology Industry Organization (BIO). Approved Biotechnology Drugs. 2003a. http://www.bio.org/index.asp?stay=yes
24. Biotechnology Industry Organization (BIO). Biotechnology Industry Statistics. 2003b. http://www.bio.org/index.asp?stay=yes
25. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Gene and Development, 2002, 16: 6～12
26. Bonner FT. Responses to drying of recalcitrant seeds of Quercus nigra L. An Bot, 1996, 78: 181～187
27. Bonnet HT, Eriksson T. Transfer of algae chloroplasts into protoplasts of higher plants. Planta, 1974, 120: 71～79
28. Borkird C, Choi JH, Sung ZR. Effect of 2, 4－Dichlorophenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program in carrot. Plant Physiol, 1986, 81: 1143～1146
29. Bottcher U, Avai D, Galun E. Complementation between protoplasts treated with either of two metabolic inhibitors results in somatic hybrid plants. Plant Sci, 1989, 63: 67
30. Boucheron E, Guivarch A, Azmi A et al. Competency of Nicotiana tabacum L. stem tissues to dedifferentiation is associated with differential levels of cell cycle gene expression and endogenous cytokinins. Planta, 2002, 215: 267～278
31. Bouget FY, Berger F, Brownlee C. Position dependent control of cell fate in the fucus embryo:

role of intercellular communication. Development, 1998, 125: 1999～2008
32. Brandenberger H, Widmer F. A new multinozzle encapsulation/immobilization system to produce uniform beads of alginate. J Biotechnol, 1998, 63: 73～80
33. Brettell RI, Dennis ES, Scowcroft Wt, et al. Molecular analysis of a somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. Mol Gen Genet, 1986, 202: 235～239
34. Brison M, Boucaud MT, Dosba F. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of two interspecific prunus rootstocks. Plant Sci, 1995, 105: 235～242
35. Brown DCW, Thorpe TA. Crop improvement through tissue culture. World J Microbiol Biotechnol, 1995, 11: 409～415
36. Butenko R, Kuchko A. Advances in protoplast research. Budapest: Akademiai Kiado Press, 1980. 293～300
37. Butenko RG, Popov AS, Volkova LA et al. Recovery of cell cultures and their biosynthetic capacity after storage of Dioscorea deltoidea and Panax ginseng in liquid nitrogen. Plant Sci Lett, 1984, 33: 285～292
38. Carlson PS. The use of protoplasts for genetic research. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, 70: 598～602
39. Castillo B, Smith MAL, Yadava UL. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of Carica papaya L. Plant Cell Rep, 1998, 17: 172～176
40. Cebolla A, Vinardell JM, Kiss E et al. The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy－dependent cell enlargement in plants. The EMBO J, 1999, 18: 4476～4484
41. Chack G, Lincoln C, Hake S. KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressioned in Arabidopsis. Plant Cell, 1996, 8: 1277～1289
42. Chaleff RS. Genetic of high plants, applications of cell culture. Cambridge: Cambridge Univ Press, 1981
43. Chand PK, Davey MR, Power JB et al. An improved procedure for protoplast fusion using polyethylene glycol. Plant Physiol, 1988, 133: 480～485
44. Chawla HS. Introduction to plant biotechnology. New Hampshire: Science Publishers Inc Enfield, 2000
45. Chawla HS. Introduction to plant biotechnology. Science Publishers, Inc. Enfield, New Hampshire USA, 2002
46. Chen JT, Chang C, Chang WC. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of Oncidium Gower Ramsey and subsequent plant regeneration. Plant Cell Reports, 1999, 19: 143～149
47. Chengalrayan K, Mhaske VB, Hazra S. Genotypic control of peanut somatic embryogenesis. Plant Cell Reports, 1998, 17: 522～525
48. Choi JH, Liu LS, Borkird C et al. Cloning of genes developmentatlly regulated during plant embryogenesis. Pro Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 1906～1910
49. Choi YE, Jeong JH. Dormancy induction of somatic embryos of Siberian ginseng by high sucrose

concentrations enhances the conservation of hydrated artificial seeds and dehydration resistance. Plant Cell Rep, 2002, 20: 1112～1116
50. Choi YE, Kim JW, Sch WY. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of Acanthopanax koreanum Nakai. Plant Cell Reports, 1997, 17: 84～88
51. Choi YE, Lee KS, Kim EY et al. Mass production of Siberian ginseng plantlets through large-scale tank culture of somatic embryos. Plant Cell Reports, 2002, 21: 24～28
52. Chuang CC, Ouyang T, Chia H et al. A set of potato medium for wheat anther culture. In: Proceeding of Symposium on Plant Tissue Culture. Peking: Science Press, 1978, 51～56
53. Chuong PV, Beversdorf WD, Powell AD et al. Somatic transfer of cytoplasmic traits in Brassica napus L. by haploid protoplast fusion. Mol Gen Genet, 1988, 211: 197～201
54. Cocking EC, George D, Price-Jones MJ et al. Selection procedures for the production of interspecies somatic hybrids of Petunia hybrida and Petunia parodii. II. Albino complementation selection. Plant Sci Lett, 1977, 10: 7～12
55. Corbineau F, Engelmann F, Come D. Ethylene production as an indicator of chilling injury in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) Plant Sci, 1990, 71: 29～34
56. Cove DJ. The generation and modification of cell polarity. J Exp Bot, 2000, 51: 831～838
57. Creissen GP, Karp A. Karyotypic changes in potato plants regenerated from protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Cult, 1985, 4: 171～182
58. Criqui MC, et al. In search of genes involved in the re-entry of mesophyll cells into the cell cycle. Physiol Plant, 1991, 82: A35
59. Davey MR, Frearson EM, Power JB. Polyethylene glycol-induced transplantation of chloroplasts into protoplasts: an ultrastructural assessment. Plant Sci Lett, 1976, 7: 7～16
60. Davey MR, Power JB. Polyethylene glycol-induced uptake of microorganisms into higher plant protoplasts: an ultrastructural study. Plant Sci Lett, 1975, 5: 269～274
61. Day JG. Cryo-cinservation of microalgae and cyanobacteria. Cryo-Letters (Supplement). 1998, 1: 7～14
62. de Jong AK, Cordewener J, Lo Schiavo F et al. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. Plant Cell. 1992, 4: 425～433
63. de Laat AMM, Blaas J. An improved method for protoplast microinjection suitable for transfer of entire plant chromosomes. Plant Sci, 1987, 50: 161～169
64. de Verno LL, Park YS, Bonga JM et al. Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce [Picea glauca (Moench) Voss]. Plant Cell Reports, 1999, 18: 948～953
65. de Vries SC, Booij H, Janssen R et al. Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled expression of correctly glycosylated extracellular protein. Genes Dev, 1988, 2: 462～476
66. Demura T, Fukuda H. Molecular cloning and characterization of cDNA associated with tracheary element differentiation in cultured Zinnia cells. Plant Physiol, 1993, 103: 815～821

67. Demura T, Fukuda H. Novel vascular cell-specific genes whose expression is regulated temporally and spatially during vascular system development. The Plant Cell, 1994, 6: 967～981.
68. Demura T, Tashiro G, Horiguchi G et al. Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. PNAS, 2002, 99: 15794～15799.
69. den Boer Bart GW, Murray James AH. Control of plant growth and development through manipulation of cell-cycle genes. Current Opinion in Biotechnol, 2000, 11: 138～145.
70. Dennis ES, Brettell RI, Peacock W J. A tissue cultured Adh1 null mutant of maize results from a single base change. Mol Gen Genet, 1987, 210: 181～183.
71. Dereuddre J, Scottez C, Arnaud Y et al. Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (Pyrus communis L. cv Beurre Hardy) in vitro plantlet to dehydration and subsequent freezing in liquid niquid nitrogen effect of previous cold harding. C. R. Acad. Sci. Paris Ser3, 1990, 310: 317～323.
72. Dominov JA, Stenzier L, Lee S et al. Cytokinins and auxins control the expression of a gene in Nicotiana Plubaginifolia cells by feedback regulation. The Plant Cell, 1992, 4: 451～461.
73. Dorffling K, Dorfflinh H, Lesselich F et al. Heritable improvement of frost tolerance in winter whet by in vitro-selection of hydroxyproline-resistant proline over producing mutants. Euphytica. 1997, 93: 1～10.
74. Druart P. In vitro gemplasm preservation technique for fruit trees. In: Schafer-Menuhr, ed, In vitro Techniques-Propagation and Long-term Storage. Nijhoff/Junk for CEC, Dordrecht, 1985, 167～171.
75. Dubois T, Guedira M, Dubois J et al. Direct somatic embryogenesis in leaves of Cichorium. A histological and SEM Study of early stages. Protoplasma, 1991, 162: 120～127.
76. Dumet D, Engelmann F, Chabrillange N. Effect of desiccation and storage temperature of the conservation of cultures of oil palm somatic embryos. Cryo-Lett, 1994, 15: 85～90.
77. Eady C, Lindsey K, Twell D. The significance of microspore division and dividion symmetry for vegetative cell-specific transcription and generative cell differentiation. The Plant Cell, 1995, 7: 65～74.
78. Endress R. Plant cell biotechnology. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994.
79. Engelmann F. In vitro conservation of tropical plant gemplasm-a review. Euphytica, 1999, 57: 227～243.
80. Engler DE, Grogan RG. Variation in lettuce plants regenerated from protoplasts. J Hered, 1984, 75: 426～430.
81. Escalona M, Lorenzo JC, González B et al. Pineapple (Ananas comosus L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Rep, 1999, 18: 743～748.
82. Fahy GM. The relevance of cryopretectant "toxicity" to cryobiology. Cryobiology, 1986, 23: 1～13.

83. Fereol L, Chovelon V, Causse S. Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in Gralic (Allium sativum L.). Plant Cell Reports, 2002, 21: 197～203
84. Fett-neto AG, Melasan SJ, Nicholson SA. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell culture of taxus cuspidate. J Biotech Bioeng, 1994, 44: 967～971
85. Figueroa FRQ, Cerda CFJF, Herrera RR et al. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of Coffea arabica. Plant Cell Reports, 2002, 20: 1141～1149
86. Finstad K, Brown DCW, Joy K. Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in alfalfa tissue culture. Plant Cell Tiss Org Cult; 1993, 34: 125～132
87. Firoozabady E, et al. Isolation, culture and cell division in cotyledon protoplast of cotton. Plant Cell Reports, 1986, 5: 127～131
88. Fish N, Karp A. Improvements in regeneration from protoplasts of potato and studies on chromosome stability. 1. The effect of initial culture media. Theor Appl Genet; 1986, 72: 405～412
89. Fowke LC, Gresshoff PM, Marchant HJ. Transfer of organelles of the algae Chlamydomonas reinnardtii into carrot cells by protoplast fusion. Planta, 1979, 144: 341～348
90. Fowler MR, Atanassova AI, Elliott MC et al. Characterization of a mak subgroup Cdc2－like protein kinase from sugar beet (Beta vulgaris L.). J Exp Bot; 2000, 51: 2119～2124
91. Franz G, Hatzopoulos P, Jones TJ et al. Molecular and genetic analysis of an embryonic gene, DC8, from Daucus carota L. Mol. Gen. Genet; 1989, 218: 143～151
92. Frugis G, Biannino MB, Dewitte W et al. Are homeobox Knotted l－like genes and cytokinins the leaf architects. Plant Physiol. 1999, 119: 371～373
93. Fukuda H. Redifferentiation of single mesophyll cells into tracheary elements. J. Plant Sci, 1994, 155: 262～271
94. Fukuda H. Tracheary element differentiation. The Plant Cell, 1997, 9: 1147～1156
95. Fukuda H. Xylogenesis: initiation, progression and cell death. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47: 299～325
96. Galbraith DW, Mauch TJ. Identification of fusion of protoplasts. II. conditions for the reproducible fluorescence labeling of protoplasts derived from mesophyll tissue. Z Pflanzenphysiol, 1980, 98: 129～140
97. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension culture of soybean roots cells. Exp Cell Res, 1968, 50: 150～158
98. Gautheret RJ. Cell differentiation and morphogenesis. In: Bergmann W (Ed): North－Holland Publishing Co., 1966, Amsterdam, 55～95
99. Giles KL. The maintenance of isolated chloroplasts in vitro and in plant. In: Schwemmlor W and Schenk H E A eds. Endocytobiology: Endosymbiosis and Cell Biology. Vol. 1. Berlin: de Gruyter, 1980, 673～684
100. limelius K, Eriksson T, Grafe R et al. Somatic hybridization of nitrate reductase deficient mu-

tants of Nicotiana tabacum by protoplast fusion. Physiol Plant, 1978, 44: 273～277
101. Goodner B, Quatrano RS. Fucus embryogenesis: a model to study the establishment of polarity. The Plant Cell, 1993, 5: 1471～1481
102. Griesbach R J. Chromosome-mediated transformation via microinjection. Plant Sci, 1987, 50: 60～77
103. Grosser JW, Collins GB. Isolation and culture of Trifolium rubens protoplasts with whole plant regeneration. Plant Sci Lett, 1984, 37: 165～170
104. Haggman HM, Ryynanen LA, Aronen TS et al. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. Plant Cell Tiss Org Cult, 1998, 54: 45～53
105. Hatzopoulos P, Fong F, Sung ZR. Abscisic acid regulation of DC8, a carrot embryonic gene. Plant Physiol, 1990, 94: 690～695
106. Harms CT, Potrykus I, Widholm JM. Complementation and dominant expression of amino acid analogue resistance markers in somatic, hybrid clones from Daucus carota after protoplast fusion. Z Pflanzenphysiol, 1981, 101: 377～385
107. Harrison RG. Observations on the living developing nerve fiber. Proc Soc Exp Biol Med, 1907, 4: 140～143
108. Hatzopoulos P, Franz G, Choy L et al. Interaction of nuclear factors with upstream sequences of a lipid body membrane protein gene from carrot. Plant Cell, 1990, 2: 457～467
109. Heath DW, Earle ED. Synthesis of oguramale sterile rapeseed (Brassica napus) with cold tolerance by protoplast fusion and effects of atrazine resistance on seed yield. Plant Cell Rep, 1996, 15: 939～944
110. Helgeson JP, Haberlach GT, Pohlman J et al. Somatic fusion of Solanum species. Plant Cell Tiss Org Cult, 1988, 12: 185～187
111. Helleboid S, Hendrike T, Bauw G et al. The major somatic embryogenesis related proteins in Cichorium identified as PR promotein. J Exp Bot, 51 (348): 1189～1200.
112. Helliot B, Panis B, Poumay Y et al. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (Musa spp.) Plant Cell Rep, 2002, 20: 1117～1122
113. Hirai D, Sakai A. Cryopreservation of in vitro-grown axillary shoot-tip meristems of mint (Mentha spicata L.) by encapsulation vitrification. Plant Cell Rep, 1999, 19: 0150～0155
114. Hitmi A, Sallanon H, Barthomeuf C. Cryopreservation of chrysanthemum cinerariaefolium vis cells and its impact on their pyrethrin biosynthesis ability. Plant Cell Rep, 1997, 17: 60～64
115. Holm PB, Knudsen S, Mouritzen R et al. Regeneration of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of the fertilized egg cell. Plant Cell, 1994, 6: 531～543
116. Horsch RB and Jones GE. A double filter paper technique for plating cultured plant cells. In vitro, 1980, 16: 103～108
117. Imai T, Irikura Y, Ishige T. Studies of the gene expression in a somatic hybrid of dihaploid Solanum tuberosum and diploid Solnum brevidens using two dimensional protein electrophoresis

Plant Cell Tiss Org Cult, 1992, 29: 115～124

118. Jacqmard A, Veylder LD, Segers G et al. Expression of CKS1At in Arabidopsis thaliana indicates a role for the protein in both the mitotic and the endoreduplication cycle. Planta, 1999, 207: 496～504
119. Jaligot E, Rival A, Beulé T et al. Somaclonal variation in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.): the DNA methylation hypothesis. Plant Cell Rep, 2000, 19: 684～690
120. Jitender SY, Manchikatla VR. Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. Plant Physiol, 1998, 116: 617～625
121. Jones H, Karp A, Jones MGK. Isolation, culture and regeneration of plants from potato protoplasts. Plant Cell Rep, 1989, 8: 307～311
122. Joshi A, Teng WL. Cryopreservation of Panax ginseng cells. Plant Cell Rep, 2000, 19: 971～977
123. Kamada H. Artificial seeds. In: Practical Technology on the Mass Production of Clonal Plants. Tokyo: CMC Publisher. 1985, 48
124. Kao KN, Michayluk MR. Nutritional requirements for growth at a very low population density in liquid media. Planta, 1975, 126: 105～110
125. Kao KN. Chromosomal behavior in somatic hybrids of soybean－Nicotiana gluca. Mol Gen Genet, 1977, 150: 225～230
126. Kartha KK, Leung NL, Pal K. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. Jam Soc Hort Sci, 1980, 105: 481～484
127. Kawahara R, Sunabort S, Fukuda H et al. A gene expressed preferentially in the globular stage of somatic embryogenesis encodes elongation factor 1a in carrot. Eur J Biochem, 1992, 209: 157～162
128. Keller WA, Melchers G. The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. Z Naturforsch, 1973, 288: 737～741
129. Khanna HK, Raina SK. Agrobacterium－mediated transfomation of indica rice cultivars using binary and superbinary vectors. Aust J Plant Physiol, 1999, 26: 311～324
130. Kim MK, Sommer HE, Bongarten BC et al. High－frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of Liquidambar styraciflua L. by thidiazuron. Plant Cell Rep, 1997, 16: 536～540
131. Kiyosue T, Yamaguchi SK, Shinozaki K et al. Isolation and characterization of a cDNA that encodes ECP31, an embryogenic－cell protein from carrot. Plant Mol Biol, 1992, 19: 239～249
132. Kiyosue T, Yamaguchi SK, Shinozaki K et al. cDNA cloning of ECP40, an embryogenic－cell protein in carrot, and its expression during somatic and zygotic embryogenesis. Plant Mol Biol, 1993, 21: 1053～1068
133. Klercker JA. Eine methods zur isoliering lebender protoplasten. Oefvers Vetenskaps Acad, Stockholm, 1892, 9: 463～471

134. Kobayashi H, Fukuda H. Involvement of calmodulin and calmodulin-binding proteins in the differentiation of tracheary elements in Zinnia cells. Planta, 1994, 194: 388～394
135. Kobayashi S, Sakai A, Ohgawara T. Cryopreservation of citrus cinensis cultured cells. In: Razdan MK and Cocking EC (eds), Conservation of Plant Genetic Resources In vitro. Vol. 1. M／S Science Publishers, Ins USA, 1997
136. Kobayashi S, Sakai A, Ohgawara T. Stable maintenance of an integrated gene in nucellar cells of navel orange (Citrus sinensis osb.) under storage in LN_2. J Japn Soc Hort Sci, 1994, 63: 553～558
137. Kotte W. Kulturversuche mit isolierten Wurzelspitzen. Beitr Allg Bot, 1922, 2: 413～434
138. Kovařík A, Koukalová B, Bezděk M et al. Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. Theor Appl Genet, 1997, 95: 301～306
139. Krumbiegel G, Schieder O. Selection of somatic hybrids after of protoplasts from Datura innoxia and Atropa belladonna. Planta, 1979, 145: 371～375
140. Kung SD, Gray JC, Wildman SG. Polypeptide composition of fraction I protein from parasexual hybrid plants in the genus Nicotiana. Science, 1975, 187: 353～355
141. Kyozuka J, Kaneda T, Shimamoto K. Production of cytoplasmic male sterile rice (Oryza sativa L.) by cell fusion. Bio／Technology, 1989, 7: 1171～1174
142. Lambardi M, Fabbri A, Caccavale A. Cryopreservation of white poplar (Populus alba L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips. Plant Cell Rep, 2000, 19: 0213～0218
143. Larkins BA, Dilkes BP, Dante RA et al. Investigating the hows and whys of DNA endoreduplicaton. J Exp Bot, 2001, 52: 183～192
144. Lee EK, Cho DY, Soh WY. Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvatin in tissue cultures of Daucus carota. Plant Cell Rep, 2001, 20: 408～415
145. Li J, Chory J. Brassinosteroids actions in plants. J Exp Bot, 1999, 50: 275～282
146. Limasset P, Cornuet P. Recherche du virus de la mosaique du Tabac dans les méristèmes des plantes infectées. C R Hebd Seances Acad Sci, 1949, 228: 1888～1890
147. Lin HS, Toorn C, Raemakers KJM et al. Development of a plant regeneration system based on friable embryogenic callus in the ornamental Alstroemeria. Plant Cell Rep, 2000, 19: 529～534
148. Lincoln C, Long J, Yamaguchi J et al. A knotted1-like homedbox gene is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpression in transgenic plants. Plant Cell, 1996, 6: 1859～1876
149. Liu CM, Xu ZH, Chua NH. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. Plant Cell, 1993, 5: 621～630
150. Liu XY, Hwang GH, Zimmerman JL. Isolation and characerization of a diverse set of genes from carrot somatic embryos. Plant Physiol, 1996, 112: 1365～1374
151. Lo KH, Giles KL, Sawhney VK. Histological changes associated with acquisition of competence for shoot regeneration in leaf discs of Saintpaulia ionantha × confusa hybrid (African violet) cul-

tured in vitro. Plant Cell Rep, 1997, 16: 421～425
152. Lorz H, Baker B, Schell J. Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. Mol Gen Genet, 1985, 199: 178～182
153. Lorz H, Paszkowski J, Dierks-Ventling C et al. Isolation and characterization of cytoplasts and miniprotoplasts derived from protoplasts of cultured cells. Physiol Plant, 1981, 53: 385～391
154. Low RK, Prakash AP, Swarup S et al. A differentially expressed bZIP gene is associated with adventitious shoot regeneration in leaf cultures of Paulownia kawakamii. Plant Cell Rep, 2000, 20: 696～700
155. Lynch PT, Isaac S, Collin HA. Uptake of protoplasts from the flamentous fungi Aspergillus nidulans and Fusarium oxysporum into protoplasts from celery (Aplum graveolens L.). Protoplasma, 1989, 150: 9～18
156. Martínez D, Tamés RS, Angeles Revilla M. Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of hop (Humulus lupulus L.) using encapsulation/dehydration. Plant Cell Rep, 1999, 19: 59～63
157. Matsubayashi Y, Morita A, Matsunaga E et al. Physiological relationships between auxin, cytokinin, and a peptide growth factor, phytosulfokine-α, in stimulation of asparagus cell proliferation. Planta, 1999, 207: 559～565
158. Matsubayashi Y, Ogawa M, Morita A et al. A LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. Science, 2002, 296: 1470～1472
159. Matsubayashi Y, Sakagami Y. 120×10^3 and 160×10^3 receptors for endogenous mitogenic peptide, phytosulfokine-α, in rice plasma membranes. J Biol Chem, 2000, 275: 15520～15525
160. Matsubayashi Y, Sakagami Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of Asparagus officinalis L. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 7623～7627
161. Matsumoto T, Mochida K, Itamura H et al. Cryopreservation of persimmon (Diospyros kaki Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. Plant Cell Rep, 2001, 20: 398～402
162. Matsumoto T, Mochida K, Itamura H et al. Cryopreservation of persimmon (Diospyros kaki Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. Plant Cell Rep, 2001, 20: 398～402
163. Matsumoto T, Sakai A, Yamada K. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristeems of wasabi (Wasabia japonica) by virification and subsequent high plant regeneration of meristematic callus of white clover (Triflium repens L.) cooled to -196 °C. Euphytica, 1993, 70: 197～203
164. Mckenzie N, Wen LY, Dale PJ. Tissue-culture enhanced transposition of the maize transposable element Dissociation in Brassica oleracea var. 'Italica'. Theor. Appl. Genet, 2002, 105: 23～33
165. Medgyesy P, Menczel L, Maliga P. The use of cytoplasmic streptomycin resistance: Chloroplast transfer from Nicotiana tabacum into Nicotiana sylvestris, and isolation of their somatic hy-

brids. Mol Gen Genet, 1980, 179: 693～698
166. Melchers G, Labib G. Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistance hybrids of haploid light sensitive varieties of tobacco. Mol Gen Genet, 1974, 135: 277～294
167. Melchers G, Mohri Y, Watanabe K et al. One－step generation of cytoplasmic male sterility by fusion of mitochondrial－inactivated tomato protoplasts with nuclear－inactivated Solanum protoplasts. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 6832～6836
168. Meyers Y, et al. Pathogenesis related proteins are expressed in tobacco mesophyll protoplasts. Physiol Plant, 1991, 82: A37
169. Michalczuk L, Cooke TJ, Cohen JD. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. Phytochemistry, 1992, 31: 1097～1103
170. Mischenko NP, Fedoreyev SA and Glazunov VP. Anthraquinone production by callus cultures of Rubia cordifolia. Fitoterapia, 1999, 70: 552～557
171. Mizuno K, Komamine A. Isolation and identification of substances inducing formation of tracheary elements in cultured carrot－root slices. Planta, 1978, 138: 59～62
172. Mol R, Mathys－Rochon E, Dumas C. In－vitro culture of fertilized embryo sacs of maize: Zygotes and two－celled proembryos can develop into plant. Planta, 1993, 189: 213～217
173. Moon DH, Ottoboni LMM, Souza AP et al. Somaclonal－variation－induced aluminum－sensitive mutant from an aluminum－inbred maize tolerant line. Plant Cell Rep, 1997, 16: 686～691
174. Moriguchi T, Kozaki I, Matsuta N et al. Plant regeneration from grape callus stored under a combination of low temperature and silicon treatment. Plant Cell Tiss Org Cult, 1988, 15: 67～71
175. Motose H, Fukuda H, Sugiyama M. Involvement of local intercellular communication in the differentiation of Zinnia mesophyll cells into tracheary elements. Planta, 2001, 213: 121～131
176. Moukadiri O, Deming J, O'Connor JE et al. Phenotypic characterization of the progenies of rice plants derived from cryopreserved calli. Plant Cell Rep, 1999, 18: 625～632
177. Muir WH, Hildebrandt AC, Riker AJ. Plant tissue cultures produced from single isolated plant cells. Science, 1954, 119: 877～878
178. Muller AJ, Grafe R. Isolation and characterization of cell lines of Nicotiana tabacum lacking nitrate reductase. Mol Gen Genet, 1978, 161: 67～76
179. Müller WA. Developmental Biology. Springer, 1998
180. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant, 1962, 15: 473～497
181. Murashige T. The impact of plant tissue culture on agriculture. In: Calgary. Thope T (Ed), Forntiers of Plant Tissue Culture. Canada: University of Calgary Press, 1978, 15～26
182. Nadel BL, Altman A, Liv M. Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspension 2. Early detection of embryogenic potential and the induction of synchronized cell cultures. Plant Cell Tiss Org Cult, 1990, 20: 119～124

183. Nagata T, Nemoto Y, Hasegawa S. Tobacco BY2 cell line as the "Hela" cell in cell biology of highter plants. Int Rev Cytol, 1992, 132: 1～30
184. Natali L, Cavallini A, Cremonini R et al. Amplification of nuclear DNA sequences during induced plant cell dedifferentiaytion. Cell Differentiation, 1986, 18: 157～161
185. Nonohay JS, Mariath JEA, Winge H. Histological analysis of somatic embryogenesis in Brizilian cultivars of berley, Hordeum vulgare vulgare, Poaceae. Plant Cell Rep, 1999, 18: 929～934
186. Padmanabhan K, Cantliffe DJ, Harrell RC et al. A comparison of shoot-forming and non-shoot forming somatic embryos of sweent potato [Ipomoea batatas (L.) Lam] using computer vision and histological analysis. Plant Cell Rep, 1998, 17: 685～692
187. Padmanabhan K, Cantliffe DJ, Koch KE. Auxin-regulated gene expression and embryogenic competence in callus cultures of sweetpotato, Ipomoea batatas (L.) Lam. Plant Cell Rep, 2001, 20: 187～192
188. Panis B, Totte N, Van Nimmen K. Cryopreservation of banana (Musa spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. Plant Sci, 1996, 121: 95～106
189. Parrott WA, merkle SA, Williams EG. Somatic embryogenesis: potential for use in propagation and gene transfer systems. In: Cab Int. Murray DR (Ed) Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology. UK: Walling ford, 158～200
190. Parrott WA. Auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of white clover. Plant Cell Rep, 1991, 10: 17～21
191. Patel AV, Pusch I, Mix-Wagner G et al. A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. Plant Cell Rep, 2000, 19: 868～874
192. Patnaik J, Sahoo S, Debata BK. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures of pamarosa grass (Cymbopogon martini). Plant Cell Rep, 1997, 16: 430～434
193. Paul H, Daigny G, Sangwan-Norreel BS et al. Cryopreservation and storage of embryogenic callus cultures of several Citrus species and cultivars. Plant Cell Rep, 2000, 19: 768～777
194. Paulet F, Eksomtramage T. Lu YH. Callus and apex crypreservation for sugarcane germplasm mangement. In: Montpellier. Proceedings of ISSCT, France: 1994
195. Pelletier G, Primard C, Vedel F et al. Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. Mol Gen Genet, 1983, 191: 244～250
196. Peres A, Ayaydin F, Nikovice K et al. Partial synchronization of cell division in cultured maize (Zea mays L.) cells: differential cyclin, cdc2, histone, and retinoblastoma transcript accumulation during the cell cycle. J Exp Bot, 1999, 50: 1373～1379
197. Pérez RM, Navarro L, Duran-Vila N. Cryopreservation and storage of embryogenic callus cultures of several Citrus species and cultivars. Plant Cell Rep, 1997, 17: 44～49
198. Peschke VM, et al. Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture-derived maize plants. Science, 1987, 238: 804～807

199. Phillips RL, Kaeppler SM, Olhoft P. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 5222～5226
200. Phunchindawan M, Hirata K, Sakai A et al. Cryopreservation of encapsulated shoot primordia induced in horseradish (Armoracia rusticana) hairy root cultures. 1997, 16: 69～473
201. Pierik RLM. In vitro culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 1～7
202. Pierik RLM. In vitro culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 107～113
203. Pojnar E, Willison JHM, Cocking C. Cell-wall regeneration by isolated tomato-fruit protoplasts. Protoplasma, 1967, 64: 460～480
204. Polge, C. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, 1949, 164: 666～668
205. Potrykus I, Hoffmann F. Transplantation of nuclei into protoplasts of higher plants. Z Pflanzenphysiol, 1973, 69: 287～289
206. Power JB, Frearson EM, Cocking EC. Some consequences of the fusion and selective culture of Petunia and Parthenocissus protoplasts. Plant Sci Lett, 1975, 5: 197～207
207. Power JB, Frearson EM, Hayward C et al. Somatic hybridization of Petunia hybrida and Petunia parodii. Nature, 1976, 263: 500～502
208. Power JB. Isolation of mature tobacco pollen protoplasts. In: Street HD (Ed). Plant Tiss Cell Cult. Blackwell: Oxford Press, 1973. 118～119
209. Radhamani J, Chandel KPS. Cryopreservation of axes of trifoliate orange (Poncirus trifoliate (L.) Raf). Plant Cell Rep, 1992, 11: 204～206
210. Ramawat KG, Merillon JM. Biotechnology Secondary Metabolites. USA: Science Publishers, Inc., 1999. 1～11
211. Rao PS. Encapsulated shoot tips of banana: a new propagation and delivery system. Infomusa, 1993, 2: 4～5
212. Reed BM. Survival of In vitro-grown apical meristems of Pyrus following cryopre-servation. Hort Sci, 1990, 25: 111～113
213. Reinert J. Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. Planta, 1959, 53: 318～333
214. Ribnicky DM, Cohen JD, Hu WS. An auxin surge following fertilization in carrots: a mechanism for regulating plant totipotency. Planta, 2002, 214: 505～509
215. Ribnicky DM, Ilic N, Cohen JD et al. The effects of exogenous auxin on endogenous indole-3-acetic acid metabolism. Plant Physiol, 1996, 112: 549～558
216. Rival A, Aberlenc F, Morcillo F et al. Scaling-up in vitro clonal propagation through somatic embryogenesis: the case of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.). Plant Tiss Cult Biotechnol, 1997, 3: 74～83

217. Robbins W.J. Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. Bot Gaz (Chicago), 1922, 73: 376～390
218. Ronchi N, Giorgetti I. In: Bajaj YPS (Ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 30. Berlin: Springer-Verlag, 1994. 3～30
219. Russell DR, Wallace KM, Bathe JH et al. Stable transformation of phaseolus vulgarzs via electric-discharge mediated particle acceleration. Plant Cell Rep, 1993, 12: 165～169
220. Russell SD. Isolation of sperm cells from the pollen of Plubago zeylanica. Plant Physiol, 1986, 81: 317～319
221. Ryynnen LA, Haggman HM. Recovery of cryopreserved silver birch shoot tips is affected by the pre-freezing age of the cultures and ammonium substitution. Plant Cell Rep, 2001, 20: 354～360
222. Sachs T. Integrating cellular and organismic aspects of vascular differentiation. Plant Cell Physiol, 2000, 41: 649～656.
223. Saka K, Katterman FR, Thomas JC. Cell regeneration and sustained division of protoplasts from cotton (Gossypium hirsutum L.). Plant Cell Rep, 1987, 6: 470～472
224. Sakai T, Liu HJ, Iwabuchi M et al. Introduction of a gene from fertility restored radish (Raphanus sativus) into Brassica napus by fusion of X-irradiated protoplasts from a radish restorer line and iodacetoamide-treated protoplasts from a cytoplasmic male-sterile cybrid of B. napus. Theor Appl Genet, 1996, 93: 373～379
225. Sano H, Grabowy C, Sager R. Loss of chlorop last DNA methylation during dedifferentiation of Chlamydomonas reinhardi gametes. Mol Cell Biol, 1984, 4: 2103～2108
226. Sarsan V, Ramsay MM, Roberts AV. In vitro germination and induction of direct somatic embryogenesis in "Bottle Palm" [Hyophorbe lagenicaulis (L. Bailey) H. E. Moore], a critically endangenered Mauritian palm. Plant Cell Rep, 2002, 20: 1107～1111
227. Saxena PK, Mii M, Crosby WL et al. Transplantation of isolated nuclei into plant protoplasts: A novel technique for introducing foreign DNA into plant cell. Planta, 1986, 168: 29～35
228. Saxena PK, Mii M, Liu Y et al. Higher nuclei yields from protoplasts of several plants. Plant Physiol, 1985b, 121: 193～197
229. Schabel-Preikstas B, Earle ED, Steponkus PL. Cryopreservation of Chrysanthemum shoot-tip by vitrification. Crycbiology, 1992b, 29: 739
230. Schenck HR, Robbelen G. Somatic hybrids by fusion of protoplasts from Brassica oleracea and Brassica campestris. Z Pflanzenzucht, 1982, 89: 278～288
231. Schmülling T. New insights into the functions of cytokinins in plant development. J Plant Growth Regulation. 2002, 21: 40～49
232. Scottez C, Chevreau E, Godard N. Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear In vitro cultures after encapsulation-dehydration. Cryobiol. 1992, 29: 691～700
233. Scragg AH and Allan EJ. In: Bajaj YPS (Ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry.

Berlin: Springer-Verlag, 1993. 249～268
234. Seabrook JEA, Douglass LK. Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. Plant Cell Rep, 2001, 20: 175～182
235. Serafimov O, Bennet D, Berner R et al. Biotechnology and the developing countries. In: European Initiative for Biotechnology Eduction, Unit 15. 1999. 9～15
236. Shashi C. Propagation of Cymbidium giganteum Wall. Through high frequency conversion of encapsulated protocorms under in vivo and in vitro conditions. Indian J Exp Biol, 1993, 31: 61～64
237. Shepard JF, Bidney D, Shahin E. Potato protoplasts in crop improvement. Science, 1980, 208: 17～24
238. Shibli RA, Haagenson DM, Cunningham SM et al. Cryopreservation of alfalfa (Medicago sativa L.) cells by encapsulation-dehydration. Plant Cell Rep, 2001, 20: 445～450
239. Shibli RA, Smity MAL, Shatnawi MA. Pigment recovery from encapsulated dehydrated Vaccinium pahalae (ohelo) cryopreserved cells. Plant Cell Tiss Org Cult, 1999, 55: 119～123
240. Shillito RD, Paszkowki J, Potrykus I. Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in number of plant species. Plant Cell Rep, 1983, 2: 244～247
241. Sinha N, Williams R, Hake S. Overexpression of the maize homeobox gene, Knotted1, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. Genes Dev, 1993, 7: 787～795.
242. Smith GJ and Muscatine L. Cell cycle of symbiotic dinoflagellates: variation in G1 phase-duration with anemone nutritional status and macronutrient supply in the Aiptasia pulchella-Symbiodinium pulchrorum symbiosis. Marine Biol, 1999, 134: 405～418
243. Snyder GW, Belknap WR. A modified method for routine Agrobacterium-mediated transformation of in vitro grown potato microtubers. Plant Cell Rep, 1993, 12: 323～327
244. Soh WY, Bhojvani SS. Morphogenesis in Plant Tissue Cultures. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999
245. Souter M, Lindsey K. Polarity and signaling in plant embryogenesis. J Exp Bot, 2000, 51: 971～983
246. Staritsky G, Dijkhuis AJ, Louwaars NP. In vitro conservation of aroid germplasm at reduced temperatures and under osmotic stress. In: Withers LA, Alderson PG (Eds). Plant Tissue Culture and Its Agricultural Applications. London: Butterworths, 1986. 277～284
247. Sterk P, Booij H, Schellekens GA et al. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. Plant Cell, 1991, 3: 907～921.
248. Sundberg E, Landgren M, Glimelius K. Fertility and chromosome stability in Brassica napus resynthesised by protoplast fusion. Progress in Plant Protoplast Research. Kluwer: Academic Publishers, 1988. 179
249. Sunnichan VG, Shivanna KR, Mohan Ram HY. Micropropagation of gum karaya (Sterculia

urens) by adventitious shoot formation and somatic embryogenesis. Plant Cell Rep, 1998, 17: 951～956

250. Szabados L, Hadiaczky GY, Dudits D. Uptake of isolated plant chromosomes by plant protoplast. Planta, 1981, 151: 141～145
251. Takahashi Y, Kuroda H, Tanaka T et al. Isolation of an auxin-regulated gene cDNA expressed during the transition from G_0 to S phase in tobacco mesophyll protoplasts. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 9279～9283
252. Tamaki M, Kusaba S, Yuriko KM et al. Ectopic expression of a tobacco homeobox gene, NTH15, dramatically alters leaf morphology and hormone levels in transgenic tobacco. Plant Cell Physiol, 1997, 38: 917～927
253. Tanaka I, Kitazuma C, Ito M. The isolation and culture of lily pollen protoplasts. Plant Sci, 1987, 50: 205～211
254. Tannoury M, Ralambosoa J, Kaminski M. Cryopreservarion by vitrification of coated shoot-tips of carnation (Dianthus caryophyllus L.) cultured in vitro. C R Acad Sci (Paris), 1991, 313, Ser. III: 633～638
255. Tay LF, Khoh LK, Loh CS et al. Alginate-chitosan coacervation in production of artificial seeds. Biotechnol Bioengineering, 1993, 42: 449～454
256. Thompson JA, Abdullah R, Cocking EC. Protoplast culture of rice (Oryza sativa L.) using media solidified with agarose. Plant Sci, 1986, 47: 123～133
257. Tremblay L, Levasseur C, Tremblay FM. Frequency of somaclonal variation in plants of Black spruce (Picea mariana Pinaceae) and White spruce (P. Glauca Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. Am J Bot, 1999, 86: 1373～1381
258. Tsukazaki H, Mii M, Tokuhara K et al. Cryopreservation of Doritaenopsis suspension culture by vitrification. Plant Cell Rep, 2000, 19: 1160～1164
259. Tylicki A, Burza W, Kuras M et al. A new way of achieving plant regeneration of Solaum lycopersicoides Dun. From root primordial culture. Plant Cell Rep, 2000, 19: 837～844
260. Uijtewaal BA, Posthumus E, Suurs CJM et al. Relative performance of monchaploid potato clone and their dihaploid parents at plant level and after protoplast isolated and subsequent fusion. Theor Appl Genet, 1987, 74: 451～458
261. Ulrich TH, Wurtele ES, Nikolau BJ. Sequence of EMB-1, an mRNA accumulating specifically in embryos of carrot. Nucl Acids Res, 1990, 18: 2826
262. van Beuzekom B. Biotechnology statistics in OCED member countries: Compendium of existing statistics. OECD STI working Papers, 2001 (6). ttp://www.oecd.org/dsti/sti/prod/sti_wp.htm
263. van Enckevart LJ, Bergervoet JE, Stiekema WJ et al. Selection of independent Ds transposon insertions in somatic tissue of potato by protoplast regeneration. Theor Appl Genet, 2000, 101:

503～510

264. van Hengel AJ, Guzzo F, van Kammen A et al. Expression patten of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension culture and developing seeds. Plant Physiol, 1998, 117: 43～53.
265. Vandenbussche B, De Proft MP. Cryopreservation of in vitro sugar beet shoot tips using the encapsulation－dehydration technique: influence of abscisic acid and cold acclimation. Plant Cell Rep, 1998, 17: 791～793
266. Vandenbussche B, Weyens G, De Proft M. Cryopreservation of in vitro sugar beet (Beta vulgaris L.) shoot tips by a vitrification technique. Plant Cell Rep, 2000, 19: 1064～1068
267. Vendrame W, Holliday C, Merkle S. Clonal propagation of hybrid sweetgum (Liquidambar styraciflua L. formosana) by somatic embryogenesis. Plant Cell Rep, 2001, 20: 691～695
268. Vesco LD, Guerra MP. The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. Paint Cell Tiss Org Cult; 2001, 64: 19～25
269. Villemont E, Dubois F, Sangwan RS et al. Role of the host cell cycle in the Agrobacterium－mediated genetic transformation of Petunia: evidence of an S－phase control mechanism for T－DNA transfer. Planta, 1997, 202: 160～172
270. Vollbrecht E, Veit B, Sinha N et al. The developmental gene Knotted－1 is a member of a maize homeobox gene family. Nature, 1991, 350: 241～243
271. von Arnold S, Eriksson T. A revised medium for growth of pea mesophyll protoplasts. Physiol Plant; 1977, 39: 257～260
272. Waara S, Pijnacker L, Ferwerda M A et al. A cytogenetic and phenotypic characterization of somatic hybrid plants obtained after fusion of two different dihaploid clones of potato (Solanum tuberosum L.). Theor Appl Genet; 1992, 85: 470～479
273. Waara S, Tegelstrom H, Wallin A et al. Somatic hybridization between anther－derived dihaploid clones of potato (Solanum tuberosum L.) and the identfication of hybrid plants by isozyme analysis. Theor Appl Genet; 1989, 77: 49～56
274. Wallin A, Glimelius K, Eriksson T. The induction of aggregation and fusion of Daucus carota protoplasts by polyethylene glycol. Z Pflanzenphysiol, 1974, 74: 64～80
275. Wang Q, Batuman？, Li P et al. Cryopreservation of in vitro－grown shoot tips of Troyer citrange [Poncirus trifoliata (L.) Raf. 2 Citrus sinensis (L.) Osbeck.] by encapsulation－dehydration. Plant Cell Rep, 2002, 20: 901～906
276. Wenel G, Foroughi－wehr B. Anther culture of cereals and grasses. In: Vasil IK (Ed), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Academic Press, INC. 1984, 283～292
277. Wetter L. Isoenzyme patterns in Soybean－Nicotiana somatic hybrid cell lines. Mol Gen Genet; 1977, 150: 231～236
278. White PR. Multiplication of the viruses of tobacco and Aucuba mosaics in growing excised tomato root tips. 1934a. Phytopath, 24: 1003～1011
279. White PR. The cultivation of animal and plant cells. 2nd ed. New York: Ronald Press, 1963

280. Wilde HD, Nelson WS, Booij WS et al. Gene expression programs in embryogenic and nonembryogenic carrot cultures. Planta, 1988, 176: 205～211
281. Wurtele ES, Wang H, Durgerian S et al. Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of Daucus carota. Plant Physiology, 1993, 102: 303～312
282. Xie DY, Hong Y. Regeneration of Acacia mangium through somatic embryogenesis. Plant Cell Rep, 2001, 20: 34～40
283. Yamamoto R, Fujioka S, Demura T et al. Brassinosteroid levels increase drastically prior to morphogenesis of tracheary elements. Plant Physiol, 2001, 125: 556～563
284. Yang G, Shen S, Kobayashi T et al. Simulatory effects of a novel peptidyl plant growth factor, phytosulfokine－α on the adventitious bud formation from callus of Antirrhinum majus. Plant Biotech, 1999, 16: 231～234
285. Yang HP, Matsubayashi Y, Nakamura K et al. Diversity of Arabidopsis genes encoding precursors for phytosulfokine, a peptide growth factor. Plant Physiol, 2001, 127: 842～851
286. Yang HP, Matsubayashi Y, Nakamura K et al. Oryza sativa PSK gene encodes a precurcor of phytosulfokine－α, a sulfated peptide growth factor found in plants. Proc Natl Acad Sci, 1999, 96: 13560～13565
287. Yang ZQ, Shikanai T, Mori K et al. Plant regeneration from cytoplasmic hybrids of rice (Oryza sativa L.). Theor Appl Genet, 1989, 77: 305～310
288. Yang ZQ, Shikanai T, Yamada Y. Asymetric hybridization between cytoplasmic male－sterile (CMS) and fertile rice (Oryza sativa L.) protoplasts. Theor Appl Genet, 1988, 76: 801～808
289. Yantcheva A, Vlahova M, Antanassov A. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (Dianthus Caryophyllus L.). Plant Cell Rep, 1998, 18: 148～153
290. Ye ZH, Varner JE. Expression of an auxin and cytokinin－regulated gene in cambial region in Zinnia. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91: 6539～6565
291. Yoshimura T, Demura T, Igarashi M et al. Differentiation expression of three genes for different β－tubulin isoforms during the initial culture of Zinnia mesophyll cells that divide and differentiate into tracheary elements. Plant Cell Physiol, 1996, 37: 1167～1176
292. Zambre MA, Clereq JD, Vranová E. Plant regeneration from embryo－derived callus in Phaseolus vulgaris L. (common bean) and P. acutifolius A. Gray (tepary bean). Plant Cell Rep, 1998, 17: 626～630
293. Zhang FL, Takahata Y, Xu JB. Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (Brassica campestris L. ssp. Pekinensis). Plant Cell Rep, 1998, 17: 780～786
294. Zhang S, Williams R, Jackson D et al. Expression of CDC2Zm and KNOTTED1 during in－vitro axillary shoot meristem proliferation and adventitious shoot meristem formation in maize (Zea mays L.) and barley (Hordeum vulgare L.). Planta, 1998, 204: 542～549
295. Zhao J, Morozova N, Williams L et al. Two phase of chromatin decondensation during dediffer-

entiation of plant cells. The J Bbiol Chem, 2001, 276: 22772～22778.
296. Zhou C, Orndorff K, Allen RD et al. Direct observations on generative cells isolated from pollen grains of Haemanthus kathrinae Baker. Plant Cell Rep, 1986, 5: 306～309
297. Zimmerman JL. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. The Plant Cell, 1993, 5: 1411～1423
298. 蔡朝晖，高山林，朱丹妮．东北红豆杉愈伤组织的诱导、生长及紫杉醇含量测定．药用生物技术，1995, 2: 11～14
299. 蔡兴奎，柳俊，谢从华．马铃薯叶肉原生质体电融合参数优化及杂种植株再生．华中农业大学学报，2003, 22 (5)：494～498
300. 常钰，刘涤，胡之璧．植物细胞和器官大规模培养研究的进展．生物技术通报，2001, 1: 31～36
301. 陈春满，郑健临，凌绪柏．象牙白的茎尖组织培养快繁研究．见：朱德蔚主编．植物组织培养与脱毒快繁技术．北京：中国科学技术出版社，2001. 233～235
302. 陈德富，陈喜文，程炳嵩．人工种子几个问题的讨论．山东农业大学学报，1995, 26: 249～256
303. 陈晓亚．植物次生代谢及其调控．见：余叔文，汤章城主编．植物生理与分子生物学．北京：科学出版社，1998. 390～400
304. 陈以峰，周燮，汤日圣等．水稻体细胞培养中胚性细胞出现与 IAA 大关系．植物学报，1998, 40: 474～477
305. 陈英，左秋仙，王瑞丰等．应用正交试验法筛选籼粳稻杂种花药培养基．见：花药培养学术讨论会文集．北京：科学出版社，1978. 40～49
306. 陈章良．植物基因工程研究．北京：北京大学出版社，2001
307. 陈正华，胡赞民，谷瑞升等．人工种子的若干理论问题与应用研究．见：许智宏主编．植物生物技术．上海：上海科学出版社，1998. 300～315
308. 成浩，王玉书，杨素娟等．大量元素对茶愈伤组织生长及儿茶素积累得影响．茶叶科学，1994, 14: 31～36
309. 程林梅，孙毅，刘少翔．基因型和激素浓度对大豆植株再生的影响．植物学通报，2001, 18: 367～370
310. 崔澈．植物组织培养中的胚状体．遗传学报，1978, 5: 79～88
311. 崔凯荣，戴若兰．体细胞胚胎发生的分子生物学．北京：科学出版社，2000. 8～12
312. 崔克明，王雅清．木质部细胞分化核脱分化的机理．西北植物学报，2000, 20: 907～921
313. 戴朝曦，孙顺娣．马铃薯实生苗子叶及下胚轴原生质体培养研究．植物学报，1994, 36: 671～678
314. 邓秀新，邓占鳌，叶新荣等．我国柑橘原生质体操作与育种研究进展．见：华南农业大学等编．农业科学集刊 (第二集)，农作物原生质体培养专集．北京：中国农业出版社，1995. 129～137

315. 刁现民，王鹏，智慧等．谷子体细胞无性系变异及其在育种上的应用．作物学报，2002，28：480～485
316. 杜娟，常国权，季静等．玉米自交系愈伤组织的诱导、RAPD分析及扫描电镜观察．作物学报，2002，26：282～285
317. 方继朝，张金渝，薛庆中等．籼稻体细胞胚胎发生特异蛋白质研究．作物学报，1994，20：395～400
318. 傅春梅，孙蒙祥，周嫦等．烟草受精后胚囊和合子的分离及合子的离体分裂．植物学报，1996，38：262～267
319. 龚明良，卜锅章，丁昌敏等．烟草原生质体融合选育新品种新进展．见：华南农业大学等编．农业科学集刊（第二集），农作物原生质体培养专集．北京：中国农业出版社，1995．13～19
320. 谷明光，郑万珍，郭丽娟等．诱导玉米花粉植株的研究．花药培养学术讨论会文集（1977）．北京：科学出版社，1978．18～26
321. 谷瑞升，陈正华，关月兰等．赤桉人工种子制备过程中微芽繁殖体转株的研究．林业科学，1998，34：26～31
322. 谷瑞升，蒋湘宁，郭仲琛．植物离体培养中器官发生调控机制度研究进展．植物学通报，1999，16：238～244
323. 顾蔚．蚕豆组织培养中植物激素对愈伤组织中单倍体和四倍体细胞的诱导．西北植物学报，1999，19：161～164
324. 官春云，李栒，李文彬．芸苔属植物的生物工程．长沙：湖南科学技术出版社，1999
325. 何亚文，贺红，张兰英等．马铃薯栽培种和野生种叶肉原生质体紫外线辐射效应．生物工程学报，1998，14：58～63
326. 胡道芬．植物花培育种进展．北京：中国农业科技出版社，1996
327. 胡含，陈英．植物体细胞遗传与作物改良．北京：北京大学出版社，1988
328. 胡适宜，李乐工，朱澄．烟草生活胚囊及胚囊原生质体的分离．植物学报，1985，27：337～344
329. 黄美娟，朱澂．花叶芋芽球人工种子研究．生物工程进展，1991，11：29～33
330. 黄艳，赵德修，李左虎．利用生物反应器培养植物细胞的研究进展（II）．植物学通报，2001，18：665～671
331. 贾敬芬，郝建国，王鸣刚等．小麦耐盐变异系的离体筛选及盐土田间试验．见：陆维忠，郑企成主编．植物细胞工程与分子育种技术研究．2003．53～58
332. 贾士荣，郭三堆，安道昌．转基因棉花．北京：科学出版社，2001
333. 简令成，孙德兰，孙龙华．甘蔗愈伤组织的超低温保存中一些因素的研究．植物学报，1987，29：123～131
334. 瞿礼嘉，顾红雅，胡苹等．现代生物技术导论．高等教育出版社和施普林格出版社，1998．1～7
335. 黎众魁，汪德耀．芦柑子叶细胞脱分化及其线粒体变化．厦门大学学报，1995，34：

99～103
336. 李爱贤，刘庆昌，王玉萍等．甘薯耐旱、耐盐突变体的离体筛选．农业生物技术学报，2002，10：15～19
337. 李宝健，曾庆平．植物生物技术．长沙：湖南科学出版社，1990．256～281
338. 李耿光，张兰英，陈如珠．马铃薯原生质体再生植株表现型变异和染色体数目变化．植物学报，1992，34：712～716
339. 李广武，郑从义，唐兵主编．低温生物学．长沙：湖南科学技术出版社，1998．1～2，30～33
340. 李浚明主编．植物组织培养教程．北京：北京农业大学出版社，1991．12～23，105～108
341. 李亮亮，朱宝成，成亚利等．掌叶半夏组织培养过程中的染色体变异．农业生物技术学报，1998，6：23～2
342. 李文彬，孙勇如，黄美娟等．对粉蓝烟草与矮牵牛体细胞杂种植株的进一步观察．遗传学报，1983，10：194
343. 李喜文，安利佳，黄百渠等．细叶黄芪叶肉原生质体发育早期几种细胞器的变化．实验生物学报，1994，27：11～23
344. 李志勇，罗焕亮，郭勇．高产 SOD大蒜悬浮细胞系的选育．广西植物，2002，22：252～255
345. 李中奎，刘成运，全明清．粳稻蒲晚一号体细胞胚发生中几种生理生化变化．武汉植物研究，1993，11：283～286
346. 梁海曼．植物组织培养中与 pH变化有关的一些问题．植物生理学通讯，1987，3：1～6
347. 梁玉玲，朱宝成，周毓君等．光对绿豆下胚轴原生质体细胞壁再生和细胞分裂的影响．作物学报，1997，23：509～510
348. 林定波，颜秋生，沈德绪．柑桶抗寒细胞变异体的获得及其抗性遗传稳定性的研究．植物学报，1999，41：136～141
349. 刘春朝，王玉春，郑重等．剪切力对植物细胞悬浮培养的影响．化工冶金，1998，19：379～384
350. 刘继红，程运江，徐小勇等．柑橘细胞工程研究进展．见：陆维忠，郑企成主编．植物细胞工程与分子育种技术研究．北京：中国农业科学技术出版社，2003．100～109
351. 刘佳佳，郭勇，郑穗平等．缺氧胁迫小细胞团法选育高产黄酮苷悬浮细胞系．中南工业大学学报，2001，32：41～45
352. 刘志伟，郭勇，张晨．植物细胞生物反应器的研究进展．现代化工，1999，19：14～16
353. 柳俊，谢从华，刘勇等．魔芋 (Amorphophallus) 离体繁殖研究．华中农业大学学报，2001，20：283～285
354. 陆瑞菊，黄建华，何南扬等．应用小孢子离体培养技术培育大麦新品系．麦类作物学报，2002，22：88～90
355. 陆维忠，程顺和，姚金宝等．体细胞无性系变异与小麦赤霉病抗性改良．见：陆维忠，

郑企成主编．植物细胞工程与分子育种技术研究．2003．40～47
356. 陆文梁．离体培养胡萝卜细胞脱分化状态下无丝分裂的活体观察．中国科学 B辑，1983，(4)：321～326
357. 吕东平，赵德修，黄艳等．前体对水母雪莲悬浮培养细胞黄酮合成的影响．云南植物研究，2001，23：497～503
358. 罗桂芬，胡虹，吕春朝等．盾叶薯蓣 (Dioscorea zingiberensis) 无菌克隆系珠芽诱导及其工厂化生产．见：朱德蔚主编．植物组织培养与脱毒快繁技术．北京：中国科学技术出版社，2001．176～177
359. 罗建平，郑光植．高产人参寡糖素培养细胞变异克隆系的筛选．云南植物研究，1995，17：83～88
360. 罗丽萍，蔡奇英，杨柏云等．龙牙百合茎尖培养及小鳞茎增殖条件的研究．见：朱德蔚主编．植物组织培养与脱毒快繁技术．北京：中国科学技术出版社，2001．150～153
361. 罗士韦，许智宏．经济植物组织培养．北京：科学出版社，1988
362. 马诚，林忠平，赵玉锦等．胡萝卜原生质体摄取玉米叶绿体的研究．植物学报，1981，23：27～30
363. 梅乐和，姚善泾，林东强．生化生产工艺学．北京：科学出版社，1999．224～237
364. 梅兴国，董妍玲，潘学武．红豆杉抗苯丙氨酸细胞系的筛选及悬浮培养特性．天然产物研究与开发，2001，13：9～12
365. 梅兴国，周爱文，柯铁等．红豆杉细胞同步化的研究．生物技术，2001，11：9～11
366. 母秋华，杨振棠，陈泽光．介绍一种玉米花药培养基．遗传，1980，2：28
367. 倪德祥，邓志龙，岑益群等．紫参和安祖花不定芽人工种子的研究．复旦学报 (自然科学版)，1994，33：542～546
368. 欧阳俊闻等．中国科学院遗传所研究工作年报 (1987—1988)．北京：科学出版社，1988．102
369. 裘文达．园艺植物组织培养．上海：上海科学技术出版社，1996
370. 冉毅东，王蒂，戴朝曦．提高马铃薯双单倍体花药培养产生胚状体及再生植株频率的研究．马铃薯杂志，1996，10：74～78
371. 佘建明，周邗扬，陆维忠等．水稻原生质体再生植株及后代的性状表现．见：华南农业大学等编．农业科学集刊 (第二集) 农作物原生质体培养专集．北京：中国农业出版社，1995．64～69
372. 沈德绪．果树育种学．上海：上海科学技术出版社，1986．327～328
373. 施中东，未作君，元英进．南方红豆杉细胞培养合成紫杉醇诱导子浓度的优化．天然产物研究与开发，1999，12：36～40
374. 司怀军，戴朝曦．马铃薯种间体细胞杂种植株的细胞学观察和过氧化物同工酶谱分析．马铃薯杂志，1998，12：195～199
375. 司怀军，谢从华，柳俊．农杆菌介导的马铃薯试管薯遗传转化体系的优化及反义 class I patatin 基因的导入．作物学报，2003，29：801～805

376. 司徒琳莉，李振山．培养基成分对东北红豆杉细胞生长和紫杉醇产量的影响．遗传，2001，23：325～328
377. 宋经元，任春玲，祁建军．生物诱导子在植物细胞培养生产次生产物中的应用．天然产物研究与开发，1999，12：101～104
378. 宋思扬，楼士林．生物技术概论．北京：科学出版社，1999．9～17
379. 孙晗笑，陆大祥，刘飞鹏．转基因技术理论与应用．郑州：河南医科大学出版社，2000
380. 孙敬三，桂耀林．植物细胞工程实验技术．北京：科学出版社，1995．314～316
381. 孙蒙祥，杨弘远，周嫦．分离烟草胚囊的新方法及诱导卵细胞与助细胞原生质体的原位融合．植物学报，1993，35：893～900
382. 孙蒙祥，杨弘远，周嫦．用聚乙二醇诱导选定的成对原生质体间的融合．植物学报，1994，36：489～493
383. 孙勇如，安锡培．植物原生质体培养．北京：科学出版社，1991
384. 孙勇如，黄美娟，李文彬等．粉蓝烟草与矮牵牛的属间体细胞杂种植株的再生．遗传学报，1982，9：284
385. 孙勇如，李文彬，李向辉．培养基对烟草叶肉原生质体再生细胞分裂及植株再生的影响．遗传学报，1979，6：427～433
386. 覃建兵，何光原．不同小麦基因型及其不同外植体离体培养研究初探．华中农业大学学报，2001，20：522～527
387. 唐东芹，钱虹妹，黄丹枫等．百合基因转化直接分化受体系统的建立．江苏农业科学，2003，3：48～51
388. 汪堃仁，薛绍白，柳惠图．细胞生物学．北京：北京师范大学出版社，1998．675～704
389. 汪泳，周嫦．烟草花粉原生质体的分离．植物学报，1995，37：413～416
390. 王蒂，司怀军，王清．马铃薯花粉原生质体分离的研究．园艺学报，1999，26：323～326
391. 王关林，方宏筠．植物基因工程原理与技术．北京：科学出版社，1998
392. 王纪方，金波，高秀云等．蔬菜组织培养．上海：上海科学技术出版社，1981．1～16，25～67
393. 王敬驹，孙敬三．花粉白苗研究．见：花药培养学术讨论会文集．北京：科学出版社，1978．141～150
394. 王君晖，黄纯农．玻璃化法——园艺作物茎尖和分生组织超低温保存的新途径．园艺学报，1994，21：277～282
395. 王君晖，黄纯农．木本植物种质超低温保存的研究进展．世界林业研究，1998，5：6～11
396. 王丽，鲍晓明，黄伯渠等．香雪兰外植体形态学极性决定的体细胞胚胎发生．植物学报，1998，40：138～143
397. 王培，陈玉蓉．C_{17}培养基在花药培养中应用的研究．植物学报，1986，28：38～45
398. 王琦，张丕方．斑叶海棠薄层培养中细胞无丝分裂及 2，4－D 的特殊效应的研究．西北

植物学报，1989，9（1）：1～5
399. 王起华，张恩栋，周春影．藻类种质超低温保存研究概况．植物学通报，2002，19：21～29
400. 王天池，林葵．电融合技术在植物细胞工程中的应用现状．植物学通报，1994，11：19～24
401. 卫志明．花药和花粉培养．见：余叔文，汤章城主编．植物生理与分子生物学（第二版）．北京：科学出版社，1998．16～29
402. 吴家睿．细胞周期的驱动及其调控．科学通报，2002，47：805～811
403. 吴其君，梅兴国，周忠强．果糖和前体对紫杉醇生物合成的影响．生命科学研究，2001，5：146～149
404. 吴新莉，周嫦．分离的黄花菜花粉生殖细胞在培养条件下的核分裂．植物学报，1990，32：577～581
405. 吴燕，周嫦．唐菖蒲花粉原生质体及其萌发花粉管的超微结构研究．植物学报，1990，32：493～498
406. 吴燕，周嫦．萱草幼嫩花粉原生质体培养启动细胞分裂的超微结构研究．植物学报，1992，34：20～25
407. 夏镇澳．植物原生质体培养和细胞杂交．见：余叔文，汤章城主编．植物生理与分子生物学（第二版）．北京：科学出版社，1998．30～53
408. 夏镇澳．植物原生质体培养理论、技术研究进展．见：华南农业大学等编．农业科学集刊（第二集），农作物原生质体培养专集．北京：中国农业出版社，1995．1～6
409. 邢更生，崔凯荣，山仑等．植物体细胞胚发生的分子基础．遗传，1999，21：30～34
410. 邢建民，查丽杭，李佐虎等．植物细胞大规模培养生物反应器研制概况．生物工程进展，1997，17：49～53
411. 熊宗贵．生物技术制药．北京：高等教育出版社，1999，1～17
412. 许萍，张丕方．关于植物细胞脱分化的研究概况．植物学通报，1996，13：20～24
413. 许智宏，卫志明．植物原生质体培养和遗传操作．上海：上海科学技术出版社，1997
414. 许智宏．植物生物技术．上海：上海科学技术出版社，1998．107～127
415. 薛建平，王汝毅，张爱民等．地黄叶片器官形态建成的研究．中国中药杂志，2003，28：21～24
416. 杨学荣，王建人，李还林等．禾谷类作物通用诱导培养基和它在提高籼稻花培绿苗频率的研究．植物生理学报，1980，6：67～74
417. 叶兴国，王连铮．大豆花药愈伤组织的分化及其内源激素分析．作物学报，1997，23：555～561
418. 殷晓辉，舒理慧，郑从义等．野生稻愈伤组织超低温保存和冻后再生植株的形成．武汉植物学报，1996，14：247～252
419. 于荣敏．植物细胞制药．见：熊宗贵主编．生物技术制药．北京：高等教育出版社，1999．205～210

420. 岳建雄，李淑君，张慧军等．陆地棉小孢子原生质体的游离与培养．见：华南农业大学等编，农业科学集刊 (第二集)，农作物原生质体培养专集．北京：中国农业出版社，1995. 118～123
421. 张宝红．甘薯叶片组织培养一次成苗的研究．遗传，1993，15：27～31
422. 张春义，杨汉民．植物体细胞无性系变异的分子基础．遗传，1994，16：44～48
423. 张冬生．植物体细胞遗传学．上海：复旦大学出版社，1989：44～51
424. 张华，向阳海，杨永华．油菜素内酯促进滇紫草细胞产生紫草色素初探．南京大学学报 (自然科学)，1999，35：151～155
425. 张丕方，王琦．烟草薄层培养中细胞早期动态的研究．植物学报，1989，31：422～426
426. 张晓伟，高睦枪，耿建峰等．利用游离小孢子培养成早熟春甘蓝新品种“豫生 1号”．园艺学报，2001，28：577
427. 张连学，常维春，魏云洁等．人参、西洋参花药超低温保存对花粉存活的影响．植物学通报，1993，10：58～59
428. 张荫麟，朱敏，赵保华．蜜环菌诱导子对廷胡索培养物生物藏积累的影响．植物学报，1992，34：658～661
429. 张自立，俞新大．植物细胞和体细胞遗传学技术与原理．北京：高等教育出版社，1990
430. 赵艳华，吴永杰，陈霜莹等．包埋干燥超低温保存苹果离体茎尖．园艺学报，1998，25：93～95
431. 郑丽屏，王玲，李勇军等．云南药用植物种质资源的试管保存技术．资源开发与市场，1999，15：3～4
432. 郑企成，陈文华，朱耀兰等．应用花药培养途径筛选小麦耐盐变异体．植物学报，1993，35：121～128
433. 周嫦，杨弘远．花粉原生质体、精子与生殖细胞的实验操作．植物学报，1989，31：726～734
434. 周嫦，杨弘远．金鱼草胚囊的人工分离研究．实验生物学报，1984，17：141～147
435. 周嫦．几种植物生活胚囊的分离与鉴定．植物学报，1985，27：258～262
436. 周嫦．三种植物花粉原生质体的大量分离与初步培养．植物学报，1988，30：362～367
437. 周嫦．萱草花粉原生质体培养启动胚胎发生．植物学报，1989，31：409～413
438. 周嫦．植物性细胞原生质体的分离、培养和融合．见：许智宏，卫志明主编．植物原生质体培养和遗传操作．上海：上海科学技术出版社，1997. 42～54
439. 周立刚，郑光植，王世林等．寡糖素对西洋参和人参愈伤组织培养的影响．天然产物研究与开发，1992，4：16～19
440. 朱澂，黄美娟，牛小牧等．胡萝卜体细胞胚在人工种子制作中的分级分选．植物学报，1990，32：871～877
441. 朱俊彦．植物体细胞在组织培养中产生胚状体．植物生理学报，1981，7：329～397
442. 朱徵，王谱，胡适宜．烟草花粉亚原生质体的分离和培养行为．实验生物学报，1985，18：135～142

443. 朱徽，谢一鸣，胡适宜．金鱼草花粉亚原生质体的分离及其在培养中的行为．植物学报，1984，26：449～455

444. 朱至清，孙敬三，李守全等．烟草叶片外植体脱分化细胞中的蛋白体．植物学报，1984，26：126～129

445. 朱至清，王敬驹，孙敬三等．通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基．中国科学（B辑），1975，（5）：484～490

446. 朱至清．植物细胞工程的理论基础：细胞全能性学说．见：陆维忠，郑企成主编．植物细胞工程与分子育种技术研究．北京：中国农业科学技术出版社，2003．3～13

中英文名词对照

A

氨　青霉素（ampicillin）
氨基酸（amino acids）

B

八倍体（octploid）
白蛋白（albumin）
半连续培养（semi－continuous culture）
半乳糖（galactose）
半纤维素（hemicellulose）
半纤维素酶（hemicellulase）
包埋玻璃化法（encapsulation－vitrifiation）
包埋脱水法（encapsulation－dehydration）
孢子体（sporophyte）
胞间连丝（plasmadesmata）
胞质体（cytoplast）
胞质杂种（cybrids）
苯基噻二唑基脲（thidiazuron，TDZ）
崩溃酶（driselase）
吡哆醇（pyridoxin，VB_6）
6－苄基嘌呤（6－benzyladenine or 6－benzylaminopurine，BA）
表达（expression）
冰冻保护剂（cryoprotective agent；CPA）
丙二酸单酰辅酶 A（malonyl CoA）
病毒粒子（virion）
病毒粒子修饰（“decoration”of virion）
玻璃化（vitrifiation）
不定根（adventitious roots）
不定芽（adventitious buds，adventitious shoots）
不对称杂种（asymmetric hybrids）

C

成批培养（batch culture）
成熟胚（mature embryo）
赤霉素（gibberellins，GA）
赤霉酸（gibberellic acid，GA_3）

D

DNA 差异扩增（DNA differential amplification）
大量元素（macroelement）
单细胞培养（single cell culture）
单性生殖（parthenogenesis）
蛋白酶（proteinase）
低温保存（cryopreservation）
地高辛（digoxin）
地衣多糖酶（lichenase）
碘乙酸（iodoacetate）
电融合（electric fusion）
电子探针（electron dense probe）
独立发展（autonomy）
对称融合（symmetric fusion）
对称杂种（symmetric hybrids）
指数生长期（exponential growth phase）
多泡体（multivesicular bodies，MVB）

E

E－花粉（embryogenesis pollen）
二倍体（diploid）
2，4－二氯苯氧乙酸（2，4－dichlorophenoxyacetic acid，2，4－D）

F

反足细胞（antipodal cell）
泛素蛋白（ubiquitin protein）
泛酸钙（Ca－pantothenate）
放线菌素 D（actinomycin－D）
非对称融合（asymmetric fusion）
非生物激发子（abiotic elicitor）

非顽拗型种子（orthodox seeds）
酚藏花红（phenosafranine）
5－氟脱氧尿苷（5－fluorodeoxyuridine, FdU）

G

干燥法（desiccation）
甘氨酸（glycine）
甘露醇（mannitol）
甘露糖（mannose或 seminose）
感受态细胞（competent cell）
根尖（root tip）
孤雄生殖（androgenesis）
鼓泡式生物反应器（bubble column bioreactor）
管家基因（house keeping gene）
管状分子（tracheary elements, TEs）
果胶酶（pectase）
果胶质（pectin）
果糖（fructose）

H

合成种子（synthetic seeds）
合点（chalaza）
核内重复复制（endoreduplication）
核酸酶（nuclease）
核酸杂交（nucleic acid hybridization, NAH）
核糖核酸酶（ribonuclease）
核型胚乳（nuclear type endosperm）
核质体（nucleoplast）
后遗传记忆（epigenetic memory）
花粉富含硫蛋白（pollen－abundant phosphoproteins）
花粉培养（pollen culture）
花药培养（anther culture）
活性炭（activated charcole）

J

肌醇（inositol）
基因枪（gene gun）
基因转化（gene transformation）
激动素，N6－呋喃甲基腺嘌呤（kinetin, KT）
激发子（elicitor）
极核（polar nucleus）
几丁质酶（chitinase）
夹层离心法（alternating－layer centrifugation）
甲基化（methylation）
5－甲基色氨酸（5－methyl tryptophan, 5MT）
假根 rhizoid
减缓期（progressive decelerational phase）
减数分裂（meiosis）
胶体金（colloided gold）
搅拌式生物反应器（stirred－tank bioreactor）
酵母提取物（yeast extract, YE）
茎尖分生组织（apical meristem）
茎片生长点（stem－disc dome）
精核（generative nucleus）
静止期（stationary phase）
局部包被的内质网（partially coated reticulum）
聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）
聚乙二醇（polyethylene glycol）
聚乙烯吡咯烷酮（polyvingyl pyrollidone, PVP）

K

看护培养（nurse culture）
抗生素（antibiotic）
抗体（antibody）
抗原（antigen）
快繁（rapid clonal propagation）

L

类伸展素蛋白（extensin－like protein）
类脂过氧化物（lipid peroxides）
离体繁殖（propagation in vitro）
连续培养（continuous culture）
流化床反应器（fluid－bed bioreactor）
硫胺素（thiamine, VB_1）
硫酸腺嘌呤（adenine sulphate）
卵裂球（blastomere）
卵细胞（egg cell）
ρ－氯苯氧乙酸（ρ－chlorophenoxy acetic acid, ρCPA）

M

麦芽糖（amylomaltose, maltose或 malt sugar）
毛地黄毒素（digitoxin）
酶联免疫吸附测定（ensyme－linked immunosorbent assay, ELISA）

免疫反应（immunology reaction）
免疫力（immunity）
免疫吸附电镜（immunosorbent electron microscopy）
膜反应器（membrane bioreactor）
木聚糖酶（xylanase）
木糖醇（xylitol）
目的基因（target gene）

N

β－奈氧乙酸（β－naphthoxy acetic acid，βNOA）
α－奈乙酸（α－naphthalene acetic acid，NAA）
内吞作用（endocytosis）
内源性激发子（endogenous elicitor）

P

胚柄（suspensor）
胚根（radicle）
胚囊（embryo sac）
胚培养（embryo culture）
胚乳培养（endosperm culture）
胚性发育（embryonal development）
胚芽（plumule）
胚珠培养（ovule culture）
胚状体（embryoid）
配子体（gametophyte）
配子－体细胞杂交（gameto－somatic hybridization）
平板培养（plating culture）
β－1，3－葡聚糖酶（β－1，3－glucanases）
葡聚糖（右旋糖酐，dextran）
葡萄糖（glucose）

Q

气升式生物反应器（airlift bioreactor）
器官发生（organogenesis）
前体（precursor）
5－羟甲基糠醛（5－hydroxymethyl－furfural）
羟基尿（hydroxyurea，HU）
羟乙基淀粉（hydroxyethyl starch，HES）
琼脂（agar）
球形胚（globular stage embryo）
全能性（totipotency）

R

人工种子（artificial seeds）

S

S－2－氨乙基半胱氨酸（S－2－aminoethyl cysteine，AEC）
S－花粉（special pollen）
山梨醇（sorbitol）
奢侈基因（luxury gene）
渗透相似蛋白（osmotin－like protein）
渗透压（osmotic pressure）
生长素（auxins）
生长素感应（perception）
生长素受体（auxin receptor）
生理隔离（physiological isolation）
生理适应性（physiological adaptation）
生物激发子（biotic elicitor）
生物技术（biotechnology）
生物素（biotin）
受体（receptor）
双单倍体（double haploid，DH）
双极性（double polarity）
水解酪蛋白（casein hydrolysate）
四倍体（tetraploid）
四分体（tetrad）
饲喂批量培养（feed－batch culture）
羧苄青霉素（carbenicillin）

T

糖（sugar）
体细胞胚发生（somatic embryogenesis）
体细胞无性系（somaclones）
体细胞无性系变异（somaclonal variation）
体细胞形态发生（somatic morphogenesis）
体细胞杂交（somatic hybridization）
体细胞种子（somatic seeds）
填充床反应器（fixed－bed bioreactor）
同核体（homokaryon）
同源盒基因（homebox gene）
同源异型域（homedomain）
退化（degeneration）

脱毒（virus elimination）
脱分化（dedifferentiation）
脱落酸（abscisic acid，ABA）

W

外遗传变异（epigenetic variation）
外源基因（foreign gene）
外源性激发子（exogenous elicitor）
外植体（explant）
顽拗型种子（recalcitrant seeds）
顽拗性（recalcitrate）
微繁（micropropagation）
微核原生质体（micronucleated protoplast）
微量元素（microelement）
微室培养（micro－chamber culture）
微细胞杂交（microcell hybridization）
微小原生质体（miniprotoplast）
微芽嫁接（micrograft）
微原生质体（microprotoplast）
维生素 B_1（thiamine－HCl）
维生素 B_2（riboflavin）
维生素 B_6（pyridoxine－HCl）
维生素（vitamin）
维生素 A（axerophthol）
维生素 B_{12}（cyanocobalamin）
维生素 C（ascorbic acid）
维生素 D_3（cholecalciferol）
无性繁殖（clonal propagation）

X

细胞分化（differentiation）
细胞分裂素（cytokinin）
细胞工程（cell engineering）
细胞全能性（cell totipotency）
细胞型胚乳（cellular type endosperm）
细胞悬浮培养（cell suspension culture）
细胞学说（cell theory）
细胞周期蛋白（cyclin）
纤维二糖（cellobiose）
纤维素（cellulose）
纤维素酶（cellulase）
显微注射法（microinjection）
腺苷（adenosine）
腺嘌呤（adenine）
小孢子（microspore）
小孢子母细胞（microspore mother cell）
小孢子培养（microspore culture）
心形胚（cordate stage embryo）
形态发生（morphogenesis）
雄配子（male gamete）
血清（serum）
血清学鉴定（serological test）
血清学（secrology）

Y

亚原生质体（subprotoplast）
烟草野火病（Pseudomonas tabaci）
烟酸（nicotinic acid，Vpp）
烟酸胺（nicotinic acid amide）
延迟期（lag phase）
阳离子铁蛋白（cationized ferritin，CF）
叶酸（folic acid）
叶原基（leaf primodia）
叶状体（thallus）
一倍体（monoploid）
伊凡蓝（Evans blue）
遗传工程品种（genetically engineered varieties）
遗传转化（genetic transformation）
乙烯利（ethrel）
异核体（heterokaryon）
异戊烯氨基嘌呤（isopentenylaminopurine，2ip）
吲哚丁酸（indole－3 butyric acid，IBA）
吲哚乙酸（indole－3－acetic acid，IAA）
荧光黄（lucifer yellow）
荧光激活细胞分选仪（fluorescence activated cell sorter，FACS）
荧光素双醋酸酯（fluorescein diacetate，FDA）
荧光增白剂（calcofluor white，CFW）
营养核（vegetative nucleus）
油菜素内酯（brassinosteroid，BR）
有性繁殖（sexual propagation）
幼胚（immature embryo or larva embryo）
诱导融合（induced fusion）
鱼雷形胚（torpedo stage embryo）

玉米素，N6－异戊烯腺嘌呤（zeatin，ZT）
预培养法（pregrowth）
预培养干燥法（pregrowth－desiccation）
愈伤组织（callus）
原胚细胞（pro－embryogenic cell）
原生质球（spheroplast）
原生质体（protoplast）
原生质体融合（protoplast fusion）

Z

载体（vector）
再分化（redifferentiation）
早熟萌发（early mature sprouting）
沼生目型胚乳（helobial type endosperm）
蔗糖（sucrose）
整合（recombination）
汁液（sap）
汁液提取染色病毒检测（detection of viruses directly on sap extracts）
脂肪氧合酶（lipoxygenase）
直系同源（orthologues）
直线生长期（linear growth phase）
植物基因工程（plant gene engineering）
植物激素（phytohormone）
植物细胞培养（plant cell culture）
指示植物（indicator plant）
指示植物鉴定（indicator plant test）
质粒（plasmid）
质体（soma plasm）
中胶层（mesoglea）
种质（germplasm）
周期蛋白依赖激酶（cyclin－dependent kinase，CDK）
周期蛋白依赖激酶抑制子（cyclin－dependent kinase inhibitor，CKI）
珠孔（micropyle）
助细胞（synergid cell）
转分化（transdifferentiation）
转座子（transposon）
子房培养（ovary culture）
子叶形胚（cotyledinous stage embryo）
自发融合（spontaneous fusion）

植物学名称对照

爱　马先蒿（Pedicularis elliotii）
芭蕉科（Musaceae）
白花丹叶烟草（Nicotiana plumbaginifolia）
白花三叶草（Trifolium repens）
甘薯（Ipomoea batatas）
白云杉（Picea glauca）
日本百合（Lilium japonicum）
百日草（Zinnia）
菠萝（Ananas comosus）
薄荷（Mentha spicata）
蚕豆（Vicia hajastana）
大叶茶（Camellia sinensis）
长春花（Catharanthus roseus）
长寿花（Kalanchoe blossfeldiana）
赤桉（Eucalyptus camaldulensis）
唇形科（Labiatae）
刺松藻（Codium fragile）
刺五加（Acanthopanax senticosus）
大花蕙兰（Cytobium）
大戟科（Euhorbiaceae）
啤酒花（Humulus lupulus）
大麦（Hordeum vulgare）
大蒜（Allium sativum）
单冠毛菊（Haplopappus）
稻稗（Echinochloa oryzicola）
地衣（Umbilicaria pustulata）
颠茄（Atropa belladona）
豆荚树（Acacia mangium）
二行芥（Diplotaxis muralis）
番木瓜（Carica papaya）
番木瓜科（Cariceae）
番茄（Lycopersicon esculentum）
番茄属（Lycopersicon）
粉蓝烟草（Nicotiana glauca）
伽蓝菜（Kalanchoe laxiflola）
伽蓝菜属（Kalanchoe）
甘蓝（Brassica oleracea）
甘蓝型油菜（Brassica napus）
枳（Poncirus trifoliata）
柑橘属（Citus）
高丽参（Acanthopanax koreanum）
谷子（Setaria italica）
海巴戟（Morinda citrifolia）
禾本科（Gramineae）
黑芥（Brassica nigel）
黑云杉（Picea mariana）
红花菜豆（Phaseolus coecineu）
胡萝卜（Daucus carota）
葫芦科（Cucurbitaceae）
花菱草（Eschscholzia californica）
花叶芋（Caladium bicolor）
华腺萼木（Mycetia sienensis）
黄花烟草（Nicotiana rustica）
黄连（Coptis chinensis）
夹竹桃科（Apocynaceae）
胶皮枫香树（Liquidambar styraciflua）
芥菜（Brassica juncea）
金花小檗（Berberis wilsonae）
金鸡纳树（Cinchona ledgeriana）
金氏烟草（Nicotiana knightiana）
金丝桃科（Hypericaceae）
锦葵科（Malvaceae）
桔梗科（Campanulaceae）
菊科（Composite）
菊芋（Helianthus tuberosus）
苦苣苔科（Gesneriaceae）
苦树（Picrasma quassioides）
块根芍药（Paeonia hybrida）
兰属（Cymbidum）
蓝猪耳草（Torenia fournier）

郎氏烟草（Nicotiana langsdorffii）
雷公藤（Tripterygium wilfordii）
藜科（Chenopodiaceae）
连翘属（Forsythia）
蓼科（Polygonaceae）
林生烟草（Nicotiana sylvestris）
柳杉（Cryptomeria japonica）
龙胆（Gentiana scabra）
芦笋（Asparagus officinalis）
陆生兰（Cymbidium spp）
驴蹄草属（Caltha）
萝卜（Raphanus sativu）
萝藦科（Asclepiadaceae）
马丁香草（Cymbopogon martinii）
马铃薯栽培种（Solanum tuberosum）
粗糙脉孢菌（Neurospora crassa）
曼陀罗（Datura strathus）
＝牛儿苗科（Geraniaceae）
毛地黄（Digitalis lanata）
毛茛科（Ranunculaceae）
毛曼陀罗（Datura innoxia）
毛霉属（Rhizopogon rubescens）
美国狼尾草（Pennisetum americanum）
猕猴桃（Actinidia deliciosa）
猕猴桃科（Actinidiaceae）
茉莉花属（Jasminum）
木兰科（Magnoliaceae）
木犀草科（Resedaceae）
木犀科（Oleaceae）
苜蓿（Medicago sativa）
苜蓿属（Medicago）
奈索菲拉烟草（Nicotiana nesophilla）
拟矮牵牛（Petunia parodii）
拟南芥（Arabidopsis thaliana）
挪威云杉（Picea abies）
爬山虎（Parthenocissus tricuspidata）
苹果（Matus domestica）
葡萄（Vitis vinifera）
荨麻科（Urticaceae）
茜草（Rubia cordifolia）
茜草科（Rubiaceae）
蔷薇科（Rosaceae）
茄科（Solanaceae）
茄属（Solanum）
芹菜（Apium graveolens）
人参（Ginkgo）
忍冬科（Caprifoliaceae）
日本榧树（Torreya nucifera）
三角叶薯蓣（Dioscorea deltoidea）
伞形科（Umbelliferae）
桑科（Moraceae）
桑树（Manihot esculenta）
山茱菜（Wasabia japonica）
麝香石竹（Dianthus caryophullus）
十字花科（Cruciferae）
石刁柏（Asparagus officinalis）
石槲兰（Dendrobium）
石竹科（Caryopyllaceae）
柿（Diospyros kaki）
薯蓣（Dioscorea spp）
双叉无隔藻（Vaucheria dichotoma）
水稻（Oryza sativa）
松科（Pinaceae）
糖松（Pinus lambertiana）
松树（Pinus taeda）
台湾泡桐（Paulownia kawakamii）
檀香（Santalum ablum）
檀香科（Santalaceae）
唐菖蒲（Gladiolus hortalans）
唐松草（Thalictrum rugosum）
天南星科（Araceae）
田旋花（Convolvulus arvensis）
甜菜（Beta vulgaris）
土壤农杆菌属（Agrobacterium）
莴苣（Lacyuca sativa）
无患子科（Sapindaceae）
梧桐（Sterculia urens）
五彩苏（Coleus blume）
五加科（Araliaceae）
西伯利亚人参（Eleutherococcus senticosus）
西藏长叶松（Pinus roxburhi）
西番莲科（Passifloraceae）
西洋参（Panax quinquefolium）
狭叶毛地黄（Digitalis lanata）

香蕉（Musa acuminata）
香雪兰（Freesia refracta）
象牙白（Cymbidium eburneum）
橡胶树（Hevea brasiliensis）
小萝卜（Raphanus sativus）
小麦（Triticum aestivum）
缬草（Valeriana wallichii）
新疆紫草（Arnebia euchroma）
杏（Prunus dulcis）
玄参科（Scrophulariaceae）
悬铃木科（Platanaceae）
旋花科（Convolvulaceae）
鸭茅状磨擦禾（Tripsacum dactyloides）
亚麻科（Linaceae）
烟草（Nicotiana tabacum）
烟草属（Nicotiana）
杨柳科（Salicaceae）
杨树（Populus beijing）
洋梨（Pyrus communis）
印度桑（Morus indica）
罂粟（Papaver somniferum）
硬粒小麦（Triticum durum）
疣粒野生稻（Oryza meyeriana）
榆科（Ulmaceae）
玉米（Zea mays）
芋（Colocasia esculenta）
鸢尾科（Iridaceae）
芸苔（Brassica campestris）
芸苔属（Brassica）
芸香科（Rutaceae）
芝麻菜（Eruca sativa）
直杆桉树（Eucalyptus maiden）
紫杉（Taxus cuspidata）
棕色固氮菌（Azotobacter vinlandii）